



# Caractérisation du protéome vasculaire de la plante modèle *Arabidopsis thaliana* et étude de son rôle dans la détoxification du cadmium

Nolwenn Jarno

## ► To cite this version:

Nolwenn Jarno. Caractérisation du protéome vasculaire de la plante modèle *Arabidopsis thaliana* et étude de son rôle dans la détoxification du cadmium. Sciences agricoles. Université de Grenoble, 2011. Français. NNT : 2011GRENV086 . tel-00945631

**HAL Id: tel-00945631**

**<https://theses.hal.science/tel-00945631>**

Submitted on 11 Mar 2014

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

## THÈSE

Pour obtenir le grade de

## DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **Chimie et Sciences du vivant**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

« **Nolwenn JARNO** »

Thèse dirigée par « **Jacques BOURGUIGNON** » et  
codirigée par « **Michel JAQUINOD** »

préparée au sein des  
**Laboratoire de Physiologie Cellulaire et Végétale (PCV)**  
UMR5168 CEA/CNRS/INRA/Univ. J. Fourier

& Etude de la Dynamique des Protéomes (EDyP)  
**Laboratoire Biologie à Grande Echelle (BGE)**  
U1038 INSERM/CEA/UJF

Institut de Recherches en Technologies et Sciences pour le Vivant (iRTSV)  
CEA/Grenoble

dans l'École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant

# Caractérisation du protéome vacuolaire de la plante modèle *Arabidopsis thaliana* et étude de son rôle dans la détoxification du cadmium

Thèse soutenue publiquement le « **1 décembre 2011** »,  
devant le jury composé de :

**Pr Christelle BRETON**

Professeur de l'Université de Grenoble présente en qualité de Présidente du jury

**Dr Jean ARMENGAUD**

Ingénieur – Chercheur CEA Cadarache présent en qualité de Rapporteur

**Dr Odile SCHILTZ**

Chercheur CNRS à l'Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale de Toulouse présente en  
qualité de Rapporteur

**Dr Michel JAQUINOD**

Ingénieur – Chercheur CEA Grenoble, co-directeur de la thèse présent en qualité de Membre du jury

**Dr Jacques BOURGUIGNON**

Ingénieur – Chercheur CEA Grenoble, co-directeur de la thèse présent en qualité de Membre du jury



---

---

À mes parents,  
À mon frère  
À mon chéri



---

# Remerciements

Voici une des premières pages du manuscrit et paradoxalement, écrire ces remerciements signifie l'achèvement de ces quatre années de thèse à Grenoble. Mon arrivée, au pays des quechuas, s'est faite un soir en TGV avec mes deux énormes valises. La première soirée, je me suis sentie bien loin de ma famille et de mes amis parisiens, et puis ce matin là en allant pour la première fois au Cea de Grenoble, j'ai découvert la vue. La vue sur ces belles montagnes, qui m'ont parues si proches qu'elles en étaient oppressantes. Elles sont finalement devenues familières et rassurantes.

L'aventure scientifique a commencé au laboratoire de Physiologie Cellulaire et Végétale (PCV) par un stage de master et s'est prolongé en collaboration avec le laboratoire de l'Etude de la Dynamique des Protéomes (EDyP) par une thèse que je détaille amplement dans la suite de ces pages. Je souhaite évidemment témoigner ma gratitude, aux personnes qui ont rendu mon accueil possible et son bon fonctionnement, la direction, Jérôme Garin, Marylin Vantard et ceux qui les ont suivis, Christophe Bruley, Myriam Ferro, Norbert Rolland et Laurent Blanchoin mais aussi les gestionnaires Patricia, Céline, Sylvianne et Sophie.

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance au Professeur Christelle Breton et aux docteurs Odile Schiltz et Jean Armengaud d'avoir accepté de lire et d'évaluer ce travail.

À PCV,

Je souhaite remercier Jacques Bourguignon qui m'a accueilli et encadré. Il m'a permis de réaliser mon rêve, faire de la recherche en biologie végétale. La confiance qu'il a bien voulu m'accorder, sa grande rigueur et son expertise scientifique ont été les clefs de la réalisation de ce travail, pendant lequel j'ai appris autonomie et patience. Merci également à Florent Villiers, qui de par son savoir-faire et sa pédagogie, m'a transmis les techniques et la passion nécessaires pour étudier les vacuoles.

Une pensée spéciale pour les thésards qui sont issus de la même couvée que moi, Djeneb, Cristian, Guillaume, Mathieu, Véranne, Vincent, Anne-Cécile, chacun prend son envol pour migrer vers un post-doc et une carrière.

Une pensée pour nos aînés qui nous survolent déjà avec assurance, Florent, Emma, Sophie, Karen, Edwige, Sylvain et Cécile. Et pleins d'encouragements pour les prochaines envolées, Didier, Camille, Morgane, Mathilde, Timothée, Florie, Théo, Laurence, Diane et Elise.

Merci à toutes celles avec qui j'ai partagé un bout de paillasse ou un bureau, l'équipe des filles, Véro, Agnès, Anne-Marie, Sassia, Virginie.



---

# Table des matières

<b>REMERCIEMENTS.....</b>	<b>5</b>
<b>TABLE DES MATIERES .....</b>	<b>7</b>
<b>PREAMBULE .....</b>	<b>9</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>13</b>
<b>I - LA VACUOLE.....</b>	<b>14</b>
<b>I.1 - Introduction historique.....</b>	<b>1</b>
<b>I.2 - Les vacuoles dans le monde du vivant .....</b>	<b>1</b>
<b>I.2.1 - Occurrence des vacuoles.....</b>	<b>15</b>
<b>I.2.2 - Distribution des vacuoles chez les eucaryotes.....</b>	<b>15</b>
<b>I.3 - Composition et origine.....</b>	<b>16</b>
<b>I.3.1 - Biogenèse .....</b>	<b>16</b>
I.3.1.1 - Réseau vacuolaire.....	16
I.3.1.2 - Évolution de la vacuole au cours de la différenciation cellulaire.....	17
<b>I.3.2 - Structure.....</b>	<b>18</b>
I.3.2.1 - PSV : les vacuoles de stockage protéique.....	18
I.3.2.2 - LV : les vacuoles lytiques .....	18
I.3.2.3 - Conversion LV-PSV et inversement .....	19
<b>I.3.3 - Composition .....</b>	<b>19</b>
<b>I.3.4 - Adressage protéique.....</b>	<b>20</b>
<b>I.3.5 - Conclusion sur la composition et l'origine des vacuoles .....</b>	<b>20</b>
<b>II - LES FONCTIONS DE LA VACUOLE VEGETALE .....</b>	<b>21</b>
<b>II.1 - Transporteurs impliqués dans ses fonctions.....</b>	<b>2</b>
<b>II.2 - Maintien de l'homéostasie cellulaire.....</b>	<b>2</b>
<b>II.2.1 - Homéostasie des micro-éléments essentiels .....</b>	<b>24</b>
II.2.1.1 - Régulations des pH cytosolique et vacuolaire .....	24
II.2.1.2 - Stockage d'ions inorganiques.....	26
a) Exemple de cations .....	27
b) Exemple d'anions .....	29
c) Conclusion sur le stockage des ions inorganiques et fonctions .....	30
II.2.1.3 - Stockage de l'eau .....	30
II.2.1.4 - Stockage de molécules plus complexes.....	31
a) Les acides aminés .....	31
b) Les sucres.....	32
c) Les acides organiques .....	33
<b>II.3 - Biosynthèse vacuolaire.....</b>	<b>33</b>
<b>II.3.1 - Anabolisme des glycosides.....</b>	<b>33</b>
<b>II.3.2 - Anabolisme de l'éthylène.....</b>	<b>34</b>
<b>II.3.3 - Anabolisme des alcaloïdes .....</b>	<b>34</b>
<b>II.4 - Dégradation et recyclage des constituants cellulaires.....</b>	<b>35</b>
<b>II.4.1 - Activités protéasiques .....</b>	<b>35</b>
II.4.1.1 - Spécificité de la vacuole.....	35
II.4.1.2 - Rôles dans le cadre du fonctionnement cellulaire .....	36
II.4.1.3 - Activités protéasiques vacuolaires liées à l'autophagie.....	36
a) Cas de carence .....	36
b) Différenciation -Indifférenciation .....	37
II.4.1.4 - Activités protéasiques vacuolaires liées à l'hétérophagie.....	37
<b>II.5 - Protection cellulaire .....</b>	<b>37</b>
<b>II.5.1 - Défense contre les pathogènes.....</b>	<b>38</b>
II.5.1.1 - Les enzymes et leurs inhibiteurs .....	38
II.5.1.2 - Les composés phénoliques .....	38
II.5.1.3 - Les alcaloïdes.....	39
<b>II.5.2 - Détoxification des xénobiotiques.....</b>	<b>40</b>
<b>II.5.3 - Détoxification des espèces actives de l'oxygène.....</b>	<b>41</b>
<b>II.5.4 - Compartimentation des métaux lourds.....</b>	<b>41</b>

<b>III -</b>	<b>POURQUOI S'INTERESSER AU CADMIUM ?</b>	<b>42</b>
III.1	-Introduction	42
III.1.1	-Historique	42
III.1.2	-Définition	42
III.1.3	-Diffusion dans l'environnement	43
III.1.3.1	- Schéma actuel	43
III.1.3.2	- Exemple de pollution	43
III.2	-Chez l'Homme	44
III.2.1	-Sources d'exposition chez l'Homme	44
III.2.2	-Mécanismes cellulaires chez l'homme	45
III.2.3	-Les maladies affectant l'Homme	45
III.2.3.1	- Cancer	46
III.2.3.2	- Toxicité hépatique et rénale	46
III.2.3.3	- Toxicité pulmonaire	46
III.2.3.4	- Autres maladies	46
III.2.3.5	- Le syndrome d'Itaï-Itaï (littéralement « j'ai mal-j'ai mal »)	47
III.3	-Conclusion sur le cadmium	47
<b>IV -</b>	<b>LE STRESS CADMIUM CHEZ LES PLANTES</b>	<b>48</b>
IV.1	-Distribution du cadmium dans la plante	48
IV.1.1	- Entrée : Le système racinaire	48
IV.1.2	- Transport par le système vasculaire	49
IV.1.3	- Le cas particulier des trichomes	52
IV.2	-Mécanismes cellulaires de la détoxification du cadmium	52
IV.2.1	- La chélation par les phytochélatines	53
IV.2.1.1	- Structure et occurrence des phytochélatines	53
IV.2.1.2	- Rôle des phytochélatines	54
IV.2.1.3	- Synthèse des phytochélatines – induction de la synthèse par le cadmium	54
IV.2.2	- Translocation et neutralisation dans la vacuole	55
IV.2.2.1	- Transport du cadmium dans la vacuole	55
IV.2.2.2	- Neutralisation du cadmium vacuolaire	56
IV.2.3	- Conclusion sur les mécanismes de détoxification du cadmium	56
<b>V -</b>	<b>ETUDE PROTEOMIQUE</b>	<b>57</b>
V.1	- L'analyse en spectrométrie de masse	57
V.1.1	- Introduction	57
V.1.1.1	- Définition	57
V.1.1.1	- Concept	57
V.1.2	- L'identification	58
V.1.2.1	- Avancées historiques	58
V.1.2.2	- Le principe – comment ?	59
V.1.2.3	- L'introduction : nanoHPLC	61
V.1.2.4	- La source : ESI	62
V.1.2.5	- Le spectromètre de masse de type Orbitrap (OT)	63
V.1.2.6	- Le spectromètre de masse de type triple quadripôle (QqQ)	64
V.1.3	- La quantification	65
V.1.3.1	- La méthode SILAC (Stable Isotope Labeling with Amino Acid)	66
V.1.3.2	- Le marquage métabolique à l'azote 15	68
V.1.3.3	- Label free	69
V.1.3.4	- La quantification par MRM	70
a)	Sélection des peptides signatures	70
œ	à partir de faits expérimentaux MS/MS	70
œ	<i>in silico</i> , par digestion et fragmentation théorique	72
b)	Les méthodes de SRM	74
œ	Construction d'une méthode SRM	74
c)	Exemple de résultats SRM	75
V.1.4	- La protéomique fonctionnelle et interactome	77
V.2	- La protéomique subcellulaire des plantes	79
V.2.1	- Fractionnement cellulaire	79
V.2.2	- Contrôle qualité et pureté	80
V.2.3	- Les données sur la vacuole	81
V.2.4	- Conclusion sur la protéomique subcellulaire des plantes	83
V.2.5	- Stress cadmium et protéomique	84
V.3	- La fouille des données	84
<b>VI -</b>	<b>LES OBJECTIFS DE LA THESE</b>	<b>85</b>

<b>MATERIELS ET METHODES.....</b>	<b>88</b>
<b>I - PREPARATION DES ECHANTILLONS BIOLOGIQUES.....</b>	<b>88</b>
<b>I.1 - Matériel Végétal et conditions de croissance.....</b>	<b>88</b>
I.1.1 - Culture <i>in vitro</i> de suspensions de cellules d' <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	88
I.1.2 - Culture <i>in vitro</i> de suspensions de cellules d' <i>Arabidopsis thaliana</i> marquées à l'azote ( $N_M = 15 \text{ g.mol}^{-1}$ ).....	88
I.1.3 - Condition de stress métallique, culture <i>in vitro</i> de suspensions de cellules d' <i>Arabidopsis thaliana</i> en présence de cadmium.....	89
I.1.4 - Cultures <i>in vitro</i> de plantules d' <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	89
I.1.5 - Cultures <i>in vitro</i> de cals racinaires d' <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	90
<b>I.2 - Isolement et purification de vacuoles intactes d'<i>Arabidopsis thaliana</i> .....</b>	<b>90</b>
I.2.1 - Préparation de protoplastes (méthode adaptée de Van der Rest et al., 2002) .....	90
I.2.1.1 - Méthode appliquée aux suspensions de cellules d'A.t. photosynthétiques .....	90
I.2.1.2 - Méthode appliquée aux racines de plantules d'A.t. ....	91
I.2.2 - Isolement de vacuoles .....	92
I.2.2.1 - Méthode du gradient unique (adaptée de Frangne et al., 2002).....	92
I.2.2.2 - Méthode du double gradient (adaptée de Jaquinod et al., 2007).....	93
<b>I.3 - Extraction de fractions enrichies en cytosol.....</b>	<b>94</b>
I.3.1 - Isolement de fractions enrichies en cytosol .....	94
<b>I.4 - Evaluation de la qualité des préparations de vacuole .....</b>	<b>94</b>
I.4.1 - Observation microscopique.....	94
I.4.2 - Activité enzymatique de l' $\alpha$ -mannosidase (méthode adaptée de Boller & Kende, 1979) .....	95
<b>I.5 - Préparation des échantillons protéiques vacuolaires.....</b>	<b>95</b>
I.5.1 - Séparation des différentes fractions vacuolaires .....	95
I.5.1.1 - Séparation simple des fractions membranaire et soluble vacuolaires .....	95
I.5.1.2 - Séparation exhaustive des fractions soluble, associée et membranaire vacuolaires.....	95
I.5.2 - Précipitation des protéines .....	96
I.5.2.1 - Précipitation des protéines au TCA .....	96
I.5.3 - Dosage des protéines vacuolaires.....	96
I.5.3.1 - Dosages des protéines vacuolaires (Bradford, 1976).....	96
I.5.4 - Tampon de charge avant dépôt sur gel SDS-PAGE .....	96
I.5.4.1 - Tampon de Laemmli (Laemmli, 1970).....	97
I.5.4.2 - Tampon de Laemmli sans réducteur .....	97
<b>II - CARACTERISATION BIOCHIMIQUE DES ECHANTILLONS .....</b>	<b>98</b>
<b>II.1 - Séparation d'échantillons protéiques par électrophorèse .....</b>	<b>98</b>
II.1.1 - Séparation des protéines par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes... 98	
II.1.1.1 - Electrophorèse à une dimension, SDS – PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis).....	98
a) Méthode SDS-PAGE classique .....	98
b) Méthode NuPage Invitrogen® .....	98
II.1.1.2 - Les différents types de migration (adapté du protocole EDyP qualité SERV_REF_002 – 01/07/2009).....	99
a) Migration « Stacking ».....	99
b) Migration « Pseudo-separating » .....	99
c) Migration « Separating complet».....	99
II.1.1.3 - Electrophorèse à deux dimensions, IEF / SDS-PAGE (IsoElectroFocusing / ...) .....	100
II.1.2 - Séparation des protéines par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions non dénaturantes :.....	101
Blue Native PAGE (méthode adaptée de Schagger & von Jagow, 1991) .....	101
II.1.2.1 - BN-PAGE : Première dimension.....	101
a) Méthode pour les échantillons solubles .....	101
b) Méthode pour les échantillons membranaires .....	102
II.1.2.2 - BN-PAGE : Seconde dimension.....	102
II.1.3 - Coloration des gels.....	103
II.1.3.1 - Coloration au bleu de Coomassie.....	103
a) Bleu de Coomassie non colloïdale .....	103
b) Bleu de Coomassie colloïdale (Candiano et al., 2004).....	103
II.1.3.2 - Coloration au nitrate d'argent .....	103
<b>II.2 - Analyses des protéines par immunodétection (Western-blot).....</b>	<b>104</b>
II.2.1 - Transfert des protéines sur membrane .....	104
II.2.2 - Immunorévélation des protéines.....	104
II.2.3 - Déhybridation de la membrane .....	105
II.2.3.1 - Déhybridation au Restore (Pierce®) .....	105
II.2.3.2 - Déhybridation en milieu acide .....	105
a) Solution acide acétique .....	105

b) Solution glycine .....	105
<b>III - ANALYSES PROTEOMIQUES.....</b>	<b>105</b>
<b>III.1 -Introduction au processus d'identification des protéines par spectrométrie de masse .....</b>	<b>105</b>
<b>III.1.1 -Principe de la spectrométrie de masse.....</b>	<b>105</b>
<b>III.1.2 -Planification des analyses dans ePims .....</b>	<b>106</b>
<b>III.2 -Pipeline d'identification des protéines par spectrométrie de masse .....</b>	<b>108</b>
<b>III.2.1 -Digestion des protéines .....</b>	<b>108</b>
III.2.1.1 - Digestion des échantillons <i>in gel</i> (Kraut et al., 2009) .....	108
III.2.1.2 - Digestion des échantillons en solution .....	108
<b>III.2.2 -Analyses NanoLC-MS/MS .....</b>	<b>109</b>
<b>III.2.3 -Analyses nanoLC-SRM .....</b>	<b>109</b>
<b>III.3 -Gestion et fouille des données protéomiques .....</b>	<b>111</b>
<b>III.3.1 -Les bases de données MSIdb.....</b>	<b>111</b>
III.3.1.1 - Introduction aux MSIdb.....	111
III.3.1.2 - MSIdb dans le cadre du projet « Vacuole ».....	111
III.3.1.3 - Utilisation hEIDI .....	112
a) Les contextes .....	112
b) Requêtes SQL .....	113
III.3.1.4 - Le grouping et la comparaison dans hEIDI.....	113
<b>III.3.2 -Recherche in silico : les bases de données en lignes.....</b>	<b>113</b>
III.3.2.1 - Les bases de données en ligne généraliste .....	114
III.3.2.2 - Les bases de données en ligne spécifique des classes de protéines.....	116
a) Classification fonctionnelle.....	116
b) Classification en famille .....	116
c) Classification des enzymes .....	116
d) Classification des peptidases.....	117
e) Classification des glycosidases .....	117
f) Classification des transporteurs .....	118
<b>III.3.3 -Les tableaux d'identification des protéines.....</b>	<b>118</b>
III.3.3.1 - Procédure pour concevoir les tableaux : .....	118
<b>III.3.4 -Les outils informatiques .....</b>	<b>120</b>
III.3.4.1 - Pour traiter les données <sup>15</sup> N .....	120
III.3.4.2 - Pour construire les méthodes SRM et analyser les résultats .....	121
III.3.4.3 - Pour les diagrammes de Venn .....	122
III.3.4.4 - Pour la bibliographie.....	122

## **CHAPITRE I : ANALYSE PROTEIQUE DE LA FRACTION SOLUBLE VACUOLAIRE D'ARABIDOPSIS THALIANA..... 124**

<b>I - INTRODUCTION .....</b>	<b>124</b>
<b>II - RESULTATS - DISCUSSION .....</b>	<b>129</b>
ARABIDOPSIS THALIANA CELL CULTURE CONDITIONS .....	132
VACUOLES ISOLATION AND PROTEIN PREPARATION.....	133
CYTOSOL-ENRICHED FRACTION PREPARATION.....	133
IEF / SDS-PAGE 2D ELECTROPHORESIS .....	133
1D BLUE NATIVE (BN) -PAGE AND 2D BN / SDS-PAGE ELECTROPHORESIS.....	134
MASS SPECTROMETRY ANALYSIS .....	135
<b>II.1 - Dissection of the soluble vacuolar proteome from <i>Arabidopsis thaliana</i> cultured cells.....</b>	<b>137</b>
<b>II.1.1 - Vacuole purification and global proteomic analysis.....</b>	<b>137</b>
<b>II.1.2 - Glycosyl hydrolases.....</b>	<b>138</b>
<b>II.1.3 - Peptidases .....</b>	<b>140</b>
II.1.3.1 - Aspartic proteases .....	141
II.1.3.2 - Cysteine proteases.....	141
II.1.3.3 - Serine proteases .....	142
II.1.3.4 - Metalloproteases .....	143
II.1.3.5 - Threonine proteases .....	144
<b>II.2 - Identification of the major soluble vacuolar proteins after separation by two-dimensional gel electrophoresis .....</b>	<b>14</b>
<b>II.3 - Comparison of the soluble vacuolar map with that of the cytosolic proteome .....</b>	<b>14</b>
<b>II.4 - Exploration of the supramolecular organization of the soluble Arabidopsis vacuolar proteome by blue native-SDS PAGE .....</b>	<b>14</b>

<b>III - CONCLUSION CHAPITRE 1.....</b>	<b>179</b>
<b>CHAPITRE II : ANALYSE PROTEIQUE DE LA FRACTION MEMBRANAIRE VACUOLAIRE D'ARABIDOPSIS THALIANA.....</b>	<b>182</b>
<b>I - INTRODUCTION.....</b>	<b>182</b>
<b>II - ANALYSE DE LA COMPOSITION PROTEIQUE DU TONOPLASTE.....</b>	<b>185</b>
<b>II.1 - Analyse globale.....</b>	<b>18</b>
<b>II.2 - Comparaison des fractions associées et strictement membranaires.....</b>	<b>18</b>
<b>II.2.1 - Les enzymes.....</b>	<b>188</b>
<b>II.2.2 - Les transporteurs.....</b>	<b>189</b>
<b>II.3 - Analyse des spécificités de la membrane.....</b>	<b>191</b>
<b>II.3.1 - Les transporteurs.....</b>	<b>192</b>
II.3.1.1 - Les pompes à protons.....	194
II.3.1.2 - Transporteurs à « ATP Binding Cassette » (ABC).....	196
II.3.1.3 - Aquaporines ( <i>Tonoplast Intrinsic Proteins</i> ).....	198
II.3.1.4 - Autres transporteurs.....	199
a) Transporteurs de métabolites de grandes tailles.....	199
b) Transporteurs de peptides et d'acides aminés.....	200
c) Transporteurs d'élément minéraux.....	201
d) Transporteurs restants.....	202
<b>II.3.2 - Autres protéines.....</b>	<b>202</b>
II.3.2.1 - Les protéines du trafic vésiculaire.....	202
II.3.2.2 - Protéines de types Band 7.....	203
II.3.2.3 - 14-3-3, Phosphatases, kinases et protéines G.....	204
II.3.2.4 - Autres protéines.....	205
<b>II.3.3 - Quelques protéases particulières.....</b>	<b>206</b>
<b>II.4 - Conclusion sur l'analyse du protéome tonoplastique.....</b>	<b>209</b>
<b>III - « SHAVE AND CONQUER ».....</b>	<b>211</b>
<b>IV - EVALUATION DE L'ORGANISATION SUPRAMOLECULAIRE DU PROTEOME VACUOLAIRE.....</b>	<b>216</b>
<b>IV.1 -Evaluation de l'organisation supramoléculaire du protéome membranaire de la vacuole.....</b>	<b>21</b>
<b>IV.2 -Conclusion.....</b>	<b>22</b>
<b>V - CONCLUSION CHAPITRE I ET II.....</b>	<b>223</b>
<b>CHAPITRE III : DYNAMIQUE DU PROTEOME VACUOLAIRE LORS D'UN STRESS ENGENDRE PAR LE CADMIUM.....</b>	<b>226</b>
<b>I - DYNAMIQUE DU PROTEOME VACUOLAIRE SANS A PRIORI.....</b>	<b>227</b>
<b>I.1 - Quantification par analyse électrophorétique à deux dimensions (IEF/SDS-PAGE).....</b>	<b>228</b>
<b>I.1.1 - Electrophorèse 2D avec marquage au soufre radioactif.....</b>	<b>228</b>
<b>I.1.2 - Electrophorèse 2D différentielle DIGE.....</b>	<b>229</b>
<b>I.2 - Quantification par marquage métabolique.....</b>	<b>231</b>
<b>I.2.1 - La méthode SILAC (<i>Stable Isotope Labeling with Amino acids in Cell culture</i>).....</b>	<b>232</b>
<b>I.2.2 - La méthode <sup>15</sup>N : marquage métabolique par l'isotope 15 de l'azote.....</b>	<b>233</b>
I.2.2.1 - Le principe.....	233
I.2.2.2 - Notre stratégie.....	235
I.2.2.3 - L'estimation du pourcentage d'incorporation.....	236
I.2.2.4 - Le traitement informatisé des données de quantification en vue de leur exploitation.....	239
a) L'identification des données dans Mascot®.....	239
b) RMI et MIME.....	240
c) Viper et DEcon2LS.....	242
d) MFPaq.....	244
e) Mascot Distiller.....	245
I.2.2.5 - Exploitation et résultats.....	245
<b>I.2.3 - Conclusion sur les approches sans a priori.....</b>	<b>245</b>
<b>II - RECHERCHE DE PROTEINES VACUOLAIRES PRESENTANT UNE REGULATION TRANSCRIPTIONNELLE PAR LE CADMIUM.....</b>	<b>246</b>
<b>II.1 - L'approche transcriptomique.....</b>	<b>246</b>
<b>II.1.1 - La base de données d'expression génique.....</b>	<b>246</b>
<b>II.1.2 - Croisement et appariement des données transcriptomiques et protéomiques.....</b>	<b>248</b>
<b>II.1.3 - Protéines vacuolaires dont les gènes ont une régulation transcriptionnelle en présence de cadmium.....</b>	<b>249</b>



II.1.3.1 - Protéines de la signalisation cellulaire et de la régulation protéique .....	253
II.1.3.2 - Transporteurs .....	254
<b>III - DYNAMIQUE DU PROTEOME VACUOLAIRE CIBLEE.....</b>	<b>256</b>
III.1.1 - Résultats .....	257
III.1.2 - Discussion .....	263
III.1.3 - Conclusion .....	265
<b>IV - CONCLUSION CHAPITRE III.....</b>	<b>265</b>
<b>CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>267</b>
<b>ANNEXES.....</b>	<b>272</b>
Annexe 1 : Principes techniques de spectrométrie de masse .....	272
I.1 - Séparation chromatographique .....	27
I.2 - La Source électrospray .....	27
I.2.1 - Le Principe .....	273
La formation du spray .....	274
La fission des gouttelettes.....	274
La formation des ions en phase gazeuse .....	275
œ Le modèle de Dole .....	275
œ Le modèle d'Iribarne et Thomson .....	275
I.2.2 - Le calcul de la masse.....	276
Les états de charge .....	276
Calcul de la masse.....	277
I.2.3 - Conclusions ESI .....	277
I.3 - Les analyseurs .....	278
I.3.1 - L'Orbitrap .....	278
Trajectoire des ions.....	279
I.3.2 - Les analyseurs de type filtre quadripolaire. ....	280
I.3.3 - Les analyseurs de type piège à ions (trappe ionique) .....	282
a) Structure de la trappe .....	282
b) Le piégeage des ions .....	283
c) L'éjection des ions .....	283
I.4 - La fragmentation des ions .....	284
I.4.1 - Principe général .....	284
I.4.2 - La fragmentation dans l'espace : cas des triples quadripôles (QqQ) .....	285
I.4.3 - La fragmentation dans le temps : cas des trappes ioniques.....	286
I.5 - L'interprétation et la validation des données.....	286
I.5.1 - Les identifications par recherche dans les banques .....	287
I.5.2 - Mascot@.....	288
Annexe 2 : Classification et nomenclature des enzymes .....	290
I.6 - Recommandations .....	29
I.7 - EC numbers .....	29
I.8 - Les 6 grandes classes d'enzymes .....	29
a) Première classe: les Oxydoréductases .....	291
b) Deuxième classe : les Transférases .....	291
c) Troisième classe : les Hydrolases.....	292
d) Quatrième classe : les Lyases.....	292
e) Cinquième classe : les Isomérases .....	293
f) Sixième classe : les Ligases .....	293
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>307</b>
A.....	307
B.....	307
C.....	309
D.....	311
E.....	312
F.....	312
G.....	313
H.....	314
I.....	316
J.....	316
K.....	317
L.....	319

M ..... 320

N ..... 322

O ..... 322

P ..... 322

Q ..... 324

R ..... 324

S ..... 325

T ..... 328

U ..... 329

V ..... 329

W ..... 330

Y ..... 331

Z ..... 331



TABLE DES MATIERES .....	1
GLOSSAIRE.....	8
<b>INTRODUCTION GENERALE .....</b>	<b>11</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>15</b>
<b>I - LA VACUOLE.....</b>	<b>17</b>
I.1 - Introduction historique.....	1
I.2 - Les vacuoles dans le monde du vivant .....	1
I.2.1 -Occurrence des vacuoles .....	19
I.2.2 -Le cas particulier des vacuoles contractiles.....	19
I.2.3 -Distribution des vacuoles chez les eucaryotes .....	20
I.3 - Composition et origine.....	21
I.3.1 -Biogenèse.....	21
I.3.1.1 - Réseau vacuolaire .....	21
I.3.1.2 - Évolution de la vacuole au cours de la différenciation cellulaire .....	22
I.3.2 -Structure .....	22
I.3.2.1 - PSV : les vacuoles de stockage protéique .....	23
I.3.2.2 - LV : les vacuoles lytiques .....	23
I.3.2.3 - Conversion LV-PSV et inversement.....	23
I.3.3 -Composition.....	24
I.3.4 -Adressage protéique.....	24
I.3.5 -Conclusion sur la composition et l'origine des vacuoles.....	25
<b>II - LES FONCTIONS DE LA VACUOLE VEGETALE .....</b>	<b>25</b>
II.1 - Transporteurs impliqués dans ses fonctions.....	2
II.2 - Maintien de l'homéostasie cellulaire.....	2
II.2.1 -Homéostasie des micro-éléments essentiels.....	29
II.2.1.1 - Régulations des pH cytosolique et vacuolaire .....	29
II.2.1.2 - Stockage d'ions inorganiques .....	32
a) Exemple de cations .....	32
b) Exemple d'anions .....	34
c) Conclusion sur le stockage des ions inorganiques et fonctions .....	35
II.2.1.3 - Stockage de l'eau.....	36
II.2.1.4 - Stockage de molécules plus complexes .....	37
a) Les acides aminés .....	37
b) Les sucres.....	38
c) Les acides organiques .....	39
II.3 - Biosynthèse vacuolaire.....	40
II.3.1 -Anabolisme des glycosides.....	40
II.3.2 -Anabolisme de l'éthylène .....	40
II.3.3 -Anabolisme des alcaloïdes .....	41
II.4 - Dégradation et recyclage des constituants cellulaires.....	41
II.4.1 -Activités protéasiques .....	42
II.4.1.1 - Spécificité de la vacuole .....	42
II.4.1.2 - Rôles dans le cadre du fonctionnement cellulaire.....	42
II.4.1.3 - Activités protéasiques vacuolaires liées à l'autophagie .....	43
a) Cas de carence .....	43
b) Différenciation -Indifférenciation .....	43
II.4.1.4 - Activités protéasiques vacuolaires liées à l'hétérophagie .....	44
II.5 - Protection cellulaire .....	44
II.5.1 -Défense contre les pathogènes.....	44
II.5.1.1 - Les enzymes et leurs inhibiteurs.....	45
II.5.1.2 - Les composées phénoliques.....	45
II.5.1.3 - Les alcaloïdes .....	46
II.5.2 -Détoxification des xénobiotiques.....	47
II.5.3 -Détoxification des espèces actives de l'oxygène.....	48
II.5.4 -Compartmentation des métaux lourds.....	48
<b>III - POURQUOI S'INTERESSER AU CADMIUM ?.....</b>	<b>49</b>
III.1 - ..... Introduction	49
III.1.1 -Historique .....	49
III.1.2 -Définition .....	50
III.1.3 -Diffusion dans l'environnement .....	51
III.1.3.1 - Schéma actuel.....	51

III.1.3.2 - Exemple de pollution .....	51
<b>III.2 - ..... Chez l'Homme</b>	<b>51</b>
III.2.1 -Sources d'exposition chez l'Homme .....	51
III.2.2 -Mécanismes cellulaires chez l'homme .....	52
III.2.3 -Les maladies affectant l'Homme .....	53
III.2.3.1 - Cancer .....	53
III.2.3.2 - Toxicité hépatique et rénale.....	54
III.2.3.3 - Toxicité pulmonaire.....	54
III.2.3.4 - Autres maladies .....	54
III.2.3.5 - Le syndrome d'Itaï-Itaï (littéralement « j'ai mal-j'ai mal ») .....	55
<b>III.3 - ..... Conclusion sur le cadmium</b>	<b>55</b>
<b>IV - LE STRESS CADMIUM CHEZ LES PLANTES .....</b>	<b>56</b>
<b>IV.1 - ..... Distribution du cadmium dans la plante</b>	<b>56</b>
IV.1.1 -Entrée : Le système racinaire.....	56
IV.1.2 -Transport par le système vasculaire .....	57
IV.1.3 -Le cas particulier des trichomes .....	60
<b>IV.2 - ..... Mécanismes cellulaires de la détoxification du cadmium</b>	<b>60</b>
IV.2.1 -La chélation par les phytochélatines.....	61
IV.2.1.1 - Structure et occurrence des phytochélatines .....	61
IV.2.1.2 - Rôle des phytochélatines .....	62
IV.2.1.3 - Synthèse des phytochélatines – induction de la synthèse par le cadmium .....	63
IV.2.2 -Translocation et neutralisation dans la vacuole.....	63
IV.2.2.1 - Transport du cadmium dans la vacuole.....	63
IV.2.2.2 - Neutralisation du cadmium vacuolaire .....	64
IV.2.3 -Conclusion sur les mécanismes de détoxification du cadmium.....	65
<b>V - ETUDE PROTEOMIQUE .....</b>	<b>66</b>
<b>V.1 - L'analyse en spectrométrie de masse .....</b>	<b>66</b>
V.1.1 -Introduction .....	66
V.1.1.1 - Définition.....	66
V.1.1.1 - Concept.....	66
V.1.2 -L'identification.....	67
V.1.2.1 - Avancées historiques.....	67
V.1.2.2 - Le principe – comment ?.....	68
V.1.2.3 - L'introduction : nanoHPLC.....	70
V.1.2.4 - La source : ESI.....	71
V.1.2.5 - Le spectromètre de masse de type Orbitrap (OT) .....	72
V.1.2.6 - Le spectromètre de masse de type triple quadripôle (QqQ) .....	73
V.1.3 -La quantification .....	74
V.1.3.1 - Le marquage métabolique à l'azote 15 .....	75
V.1.3.2 - Label free .....	76
V.1.4 -La protéomique fonctionnelle et interactome.....	77
<b>V.2 - La protéomique subcellulaire des plantes .....</b>	<b>78</b>
V.2.1 -Fractionnement cellulaire .....	79
V.2.2 -Contrôle qualité et pureté.....	80
V.2.3 -Les données sur la vacuole.....	81
V.2.4 -Conclusion sur la protéomique subcellulaire des plantes.....	83
V.2.5 -Stress cadmium et protéomique .....	84
<b>V.3 - La fouille des données .....</b>	<b>84</b>
<b>VI - LES OBJECTIFS DE LA THESE .....</b>	<b>85</b>
<b>CHAPITRE I : ANALYSE PROTEIQUE DE LA FRACTION SOLUBLE VACUOLAIRE D'ARABIDOPSIS THALIANA.....</b>	<b>89</b>
<b>I - INTRODUCTION .....</b>	<b>89</b>
<b>II - RESULTATS - DISCUSSION .....</b>	<b>94</b>
ARABIDOPSIS THALIANA CELL CULTURE CONDITIONS .....	97
VACUOLES ISOLATION AND PROTEIN PREPARATION.....	98
CYTOSOL-ENRICHED FRACTION PREPARATION.....	98
IEF / SDS-PAGE 2D ELECTROPHORESIS .....	98
1D BLUE NATIVE (BN) -PAGE AND 2D BN / SDS-PAGE ELECTROPHORESIS .....	99
MASS SPECTROMETRY ANALYSIS .....	100
<b>II.1 - Dissection of the soluble vacuolar proteome from <i>Arabidopsis thaliana</i> cultured cells.....</b>	<b>102</b>

II.1.1 -Vacuole purification and global proteomic analysis.....	102
II.1.2 -Glycosyl hydrolases .....	103
II.1.3 -Peptidases .....	105
II.1.3.1 - Aspartic proteases.....	106
II.1.3.2 - Cysteine proteases .....	106
II.1.3.3 - Serine proteases .....	107
II.1.3.4 - Metalloproteases.....	108
II.1.3.5 - Threonine proteases.....	109
II.2 - Identification of the major soluble vacuolar proteins after separation by two-dimensional gel electrophoresis .....	10
II.3 - Comparison of the soluble vacuolar map with that of the cytosolic proteome .....	11
II.4 - Exploration of the supramolecular organization of the soluble Arabidopsis vacuolar proteome by blue native-SDS PAGE .....	11
FIGURE 1 .....	138
FIGURE 2 .....	139
FIGURE 3 .....	140
FIGURE 4 .....	141
FIGURE 5 .....	142
SUPPLEMENTAL FIGURE 1.....	143
<b>III - CONCLUSION CHAPITRE 1.....</b>	<b>144</b>
<b>CHAPITRE II : ANALYSE PROTEIQUE DE LA FRACTION MEMBRANAIRE VACUOLAIRE D'ARABIDOPSIS THALIANA.....</b>	<b>147</b>
<b>I - INTRODUCTION .....</b>	<b>147</b>
<b>II - ANALYSE DE LA COMPOSITION PROTEIQUE DU TONOPLASTE.....</b>	<b>150</b>
II.1 - Analyse globale.....	15
II.2 - Comparaison des fractions associées et strictement membranaires.....	15
II.2.1 -Les enzymes.....	153
II.2.2 -Les transporteurs.....	154
II.3 - Analyse des spécificités de la membrane .....	156
II.3.1 -Les transporteurs.....	157
II.3.1.1 - Les pompes à protons .....	159
II.3.1.2 - Transporteurs à « ATP Binding Cassette » (ABC) .....	161
II.3.1.3 - Aquaporines ( <i>Tonoplast Intrinsic Proteins</i> ) .....	163
II.3.1.4 - Autres transporteurs.....	164
a) Transporteurs de métabolites de grandes tailles .....	164
b) Transporteurs de peptides et d'acides aminés .....	165
c) Transporteurs d'élément minéraux.....	166
d) Transporteurs restants .....	167
II.3.2 -Autres protéines.....	167
II.3.2.1 - Les protéines du trafic vésiculaire .....	167
II.3.2.2 - Protéines de types Band 7.....	168
II.3.2.3 - 14-3-3, Phosphatases, kinases et protéines G .....	169
II.3.2.4 - Autres protéines.....	170
II.3.3 -Quelques protéases particulières .....	171
II.4 - Conclusion sur l'analyse du protéome tonoplastique .....	174
<b>III - « SHAVE AND CONQUER ».....</b>	<b>176</b>
<b>IV - EVALUATION DE L'ORGANISATION SUPRAMOLECULAIRE DU PROTEOME VACUOLAIRE .....</b>	<b>181</b>
IV.1 -..... Evaluation de l'organisation supramoléculaire du protéome membranaire de la vacuol	
IV.2 -..... Conclusio	
<b>V - CONCLUSION CHAPITRE I ET II .....</b>	<b>188</b>
<b>CHAPITRE III : DYNAMIQUE DU PROTEOME VACUOLAIRE LORS D'UN STRESS ENGENDRE PAR LE CADMIUM .....</b>	<b>191</b>
<b>I - DYNAMIQUE DU PROTEOME VACUOLAIRE SANS A PRIORI .....</b>	<b>192</b>
I.1 - Quantification par analyse électrophorétique à deux dimensions (IEF/SDS-PAGE) .....	193
I.1.1 -Electrophorèse 2D avec marquage au soufre radioactif.....	193
I.1.2 -Electrophorèse 2D différentielle DIGE.....	194

1.2 - Quantification par marquage métabolique .....	197
1.2.1 -La méthode SILAC ( <i>Stable Isotope Labeling with Amino acids in Cell culture</i> ).....	198
1.2.2 -La méthode $^{15}\text{N}$ : marquage métabolique par l'isotope 15 de l'azote.....	200
1.2.2.1 - Le principe.....	200
1.2.2.2 - Notre stratégie.....	202
1.2.2.3 - L'estimation du pourcentage d'incorporation .....	203
1.2.2.4 - Le traitement informatisé des données de quantification en vue de leur exploitation.....	206
a) L'identification des données dans Mascot®.....	206
b) RMI et MIME.....	207
c) Viper et DEcon2LS.....	209
d) MFPaq .....	211
e) Mascot Distiller.....	212
1.2.2.5 - Exploitation et résultats.....	212
1.2.3 -Conclusion sur les approches sans <i>a priori</i> .....	212
II - RECHERCHE DE PROTEINES VACUOLAIRES PRESENTANT UNE REGULATION TRANSCRIPTIONNELLE PAR LE CADMIUM .....	213
II.1 -L'approche transcriptomique.....	213
II.1.1 -La base de données d'expression génique.....	213
II.1.2 -Croisement et appariement des données transcriptomiques et protéomiques.....	215
II.1.3 -Protéines vacuolaires dont les gènes ont une régulation transcriptionnelle en présence de cadmium..	216
II.1.3.1 - Protéines de la signalisation cellulaire et de la régulation protéique.....	220
II.1.3.2 - Transporteurs .....	221
III - DYNAMIQUE DU PROTEOME VACUOLAIRE CIBLEE.....	223
III.1.1 -Le principe.....	224
III.1.2 -Sélection des peptides signatures .....	225
III.1.2.1 - à partir de faits expérimentaux MS/MS.....	225
Exemple At2g02040.....	227
III.1.2.2 - <i>in silico</i> , par digestion et fragmentation théorique .....	227
Exemple At2g02040 .....	228
III.1.3 -Les méthodes de SRM.....	229
III.1.3.1 - Construction d'une méthode SRM .....	229
III.1.4 -Exemple de résultats SRM .....	230
III.1.5 -Résultats.....	232
III.1.6 -Discussion.....	239
III.1.7 -Conclusion .....	241
IV - CONCLUSION CHAPITRE III.....	241
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	243
PROTEOTHEQUE VACUOLAIRE.....	249
MATERIELS ET METHODES.....	307
I - PREPARATION DES ECHANTILLONS BIOLOGIQUES.....	307
I.1 - Matériel Végétal et conditions de croissance.....	307
I.1.1 -Culture <i>in vitro</i> de suspensions de cellules d' <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	307
I.1.2 -Culture <i>in vitro</i> de suspensions de cellules d' <i>Arabidopsis thaliana</i> marquées à l'azote ( $\text{N}_\text{M} = 15 \text{ g.mol}^{-1}$ ) ...	307
I.1.3 -Condition de stress métallique, culture <i>in vitro</i> de suspensions de cellules d' <i>Arabidopsis thaliana</i> en présence de cadmium.....	308
I.1.4 -Cultures <i>in vitro</i> de plantules d' <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	309
I.1.5 -Cultures <i>in vitro</i> de cals racinaires d' <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	309
I.2 - Isolement et purification de vacuoles intactes d' <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	310
I.2.1 -Préparation de protoplastes (méthode adaptée de Van der Rest et al., 2002).....	310
I.2.1.1 - Méthode appliquée aux suspensions de cellules d' <i>A.t.</i> photosynthétiques.....	310
I.2.1.2 - Méthode appliquée aux racines de plantules d' <i>A.t.</i> .....	310
I.2.2 -Isolement de vacuoles.....	311
I.2.2.1 - Méthode du gradient unique (adaptée de Frangne <i>et al.</i> , 2002) .....	311
I.2.2.2 - Méthode du double gradient (adaptée de Jaquinod <i>et al.</i> , 2007).....	312
I.3 - Extraction de fractions enrichies en cytosol.....	313
I.3.1 -Isolement de fractions enrichies en cytosol .....	313
I.4 - Evaluation de la qualité des préparations de vacuole .....	313
I.4.1 -Observation microscopique .....	313
I.4.2 -Activité enzymatique de l' $\alpha$ -mannosidase (méthode adaptée de Boller & Kende, 1979).....	314
I.5 - Préparation des échantillons protéiques vacuolaires.....	314

<b>I.5.1 - Séparation des différentes fractions vacuolaires.....</b>	<b>314</b>
I.5.1.1 - Séparation simple des fractions membranaire et soluble vacuolaires.....	314
I.5.1.2 - Séparation exhaustive des fractions soluble, associée et membranaire vacuolaires .....	314
<b>I.5.2 -Précipitation des protéines .....</b>	<b>315</b>
I.5.2.1 - Précipitation des protéines au TCA.....	315
<b>I.5.3 -Dosage des protéines vacuolaires .....</b>	<b>315</b>
I.5.3.1 - Dosages des protéines vacuolaires (Bradford, 1976) .....	315
<b>I.5.4 -Tampon de charge avant dépôt sur gel SDS-PAGE.....</b>	<b>315</b>
I.5.4.1 - Tampon de Laemmli (Laemmli, 1970).....	316
I.5.4.2 - Tampon de Laemmli sans réducteur.....	316
<b>II - CARACTERISATION BIOCHIMIQUE DES ECHANTILLONS .....</b>	<b>317</b>
<b>II.1 - Séparation d'échantillons protéiques par électrophorèse .....</b>	<b>317</b>
<b>II.1.1 -Séparation des protéines par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes ..</b>	<b>317</b>
II.1.1.1 - Electrophorèse à une dimension, SDS – PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis).....	317
a) Méthode SDS-PAGE classique .....	317
b) Méthode NuPage Invitrogen® .....	317
II.1.1.2 - Les différents types de migration (adapté du protocole EDyP qualité SERV_REF_002 – 01/07/2009).....	318
a) Migration « Stacking ».....	318
b) Migration « Pseudo-separating » .....	318
c) Migration « Separating complet».....	318
II.1.1.3 - Electrophorèse à deux dimensions, IEF / SDS-PAGE (IsoElectroFocusing / ...).....	319
<b>II.1.2 -Séparation des protéines par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions non dénaturantes :.....</b>	<b>320</b>
<b>Blue Native PAGE (méthode adaptée de Schagger &amp; von Jagow, 1991) .....</b>	<b>320</b>
II.1.2.1 - BN-PAGE : Première dimension .....	320
a) Méthode pour les échantillons solubles .....	320
b) Méthode pour les échantillons membranaires .....	321
II.1.2.2 - BN-PAGE : Seconde dimension .....	321
<b>II.1.3 -Coloration des gels.....</b>	<b>322</b>
II.1.3.1 - Coloration au bleu de Coomassie .....	322
a) Bleu de Coomassie non colloïdale .....	322
b) Bleu de Coomassie colloïdale (Candiano et al., 2004).....	322
II.1.3.2 - Coloration au nitrate d'argent .....	322
<b>II.2 - Analyses des protéines par immunodétection (Western-blot).....</b>	<b>323</b>
<b>II.2.1 -Transfert des protéines sur membrane .....</b>	<b>323</b>
<b>II.2.2 -Immunorévélation des protéines .....</b>	<b>323</b>
<b>II.2.3 -Déhybridation de la membrane .....</b>	<b>324</b>
II.2.3.1 - Déhybridation au Restore (Pierce®).....	324
II.2.3.2 - Déhybridation en milieu acide.....	324
a) Solution acide acétique .....	324
b) Solution glycine .....	324
<b>III - ANALYSES PROTEOMIQUES.....</b>	<b>324</b>
<b>III.1 - ..... Introduction au processus d'identification des protéines par spectrométrie de masse</b>	<b>324</b>
<b>III.1.1 -Principe de la spectrométrie de masse.....</b>	<b>324</b>
<b>III.1.2 -Planification des analyses dans ePims .....</b>	<b>325</b>
<b>III.2 - ..... Pipeline d'identification des protéines par spectrométrie de masse</b>	<b>327</b>
<b>III.2.1 -Digestion des protéines.....</b>	<b>327</b>
III.2.1.1 - Digestion des échantillons <i>in gel</i> (Kraut et al., 2009).....	327
III.2.1.2 - Digestion des échantillons en solution .....	327
<b>III.2.2 -Analyses NanoLC-MS/MS.....</b>	<b>328</b>
III.2.2.1 - Analyse nanoLC-MS/MS .....	Error! Bookmark not defined.
<b>III.2.3 -Analyses nanoLC-SRM .....</b>	<b>328</b>
III.2.3.1 - Analyse nanoLC-SRM .....	Error! Bookmark not defined.
<b>III.3 - ..... Gestion et fouille des données protéomiques</b>	<b>330</b>
<b>III.3.1 -Les bases de données MSIdb .....</b>	<b>330</b>
III.3.1.1 - Introduction aux MSIdb .....	330
III.3.1.2 - MSIdb dans le cadre du projet « Vacuole » .....	330
III.3.1.3 - Utilisation hEIDI.....	331
a) Les contextes .....	331
b) Requêtes SQL .....	332
III.3.1.4 - Le grouping et la comparaison dans hEIDI .....	332
<b>III.3.2 -Recherche in silico : les bases de données en lignes .....</b>	<b>332</b>
III.3.2.1 - Les bases de données en ligne généraliste.....	333
III.3.2.2 - Les bases de données en ligne spécifique des classes de protéines .....	335



a)	Classification fonctionnelle.....	335
b)	Classification en famille .....	335
c)	Classification des enzymes .....	335
d)	Classification des peptidases.....	336
e)	Classification des glycosidases .....	336
f)	Classification des transporteurs .....	337
<b>III.3.3</b>	<b>-Les tableaux d'identification des protéines .....</b>	<b>337</b>
III.3.3.1	- Procédure pour concevoir les tableaux : .....	337
<b>III.3.4</b>	<b>-Les outils informatiques .....</b>	<b>339</b>
III.3.4.1	- Pour traiter les données <sup>15</sup> N.....	339
III.3.4.2	- Pour construire les méthodes SRM et analyser les résultats .....	340
III.3.4.3	- Pour les diagrammes de Venn.....	341
III.3.4.4	- Pour la bibliographie .....	341
<b>ANNEXES</b>	<b>.....</b>	<b>343</b>
<b>Annexe 1 : Principes techniques de spectrométrie de masse .....</b>	<b>.....</b>	<b>343</b>
<b>I.1 - Séparation chromatographique .....</b>	<b>.....</b>	<b>34</b>
<b>I.2 - La Source électrospray .....</b>	<b>.....</b>	<b>34</b>
<b>I.2.1 -Le Principe.....</b>	<b>.....</b>	<b>344</b>
i.	La formation du spray .....	345
ii.	La fission des gouttelettes.....	345
iii.	La formation des ions en phase gazeuse.....	346
œ	Le modèle de Dole .....	346
œ	Le modèle d'Iribarne et Thomson.....	346
<b>I.2.2 -Le calcul de la masse .....</b>	<b>.....</b>	<b>347</b>
i.	Les états de charge.....	347
ii.	Calcul de la masse .....	348
<b>I.2.3 Conclusions ESI.....</b>	<b>.....</b>	<b>348</b>
<b>I.3 - Les analyseurs .....</b>	<b>.....</b>	<b>349</b>
<b>I.3.1 L'Orbitrap.....</b>	<b>.....</b>	<b>349</b>
	Trajectoire des ions.....	350
<b>I.3.2 -Les analyseurs de type filtre quadripolaire.....</b>	<b>.....</b>	<b>351</b>
<b>I.3.3 -Les analyseurs de type piège à ions (trappe ionique) .....</b>	<b>.....</b>	<b>353</b>
a)	Structure de la trappe .....	353
b)	Le piégeage des ions .....	354
c)	L'éjection des ions .....	354
<b>I.4 - La fragmentation des ions .....</b>	<b>.....</b>	<b>355</b>
<b>I.4.1 -Principe général.....</b>	<b>.....</b>	<b>355</b>
<b>I.4.2 -La fragmentation dans l'espace : cas des triples quadripôles (QqQ).....</b>	<b>.....</b>	<b>356</b>
<b>I.4.3 -La fragmentation dans le temps : cas des trappes ioniques .....</b>	<b>.....</b>	<b>357</b>
<b>I.5 - L'interprétation et la validation des données.....</b>	<b>.....</b>	<b>357</b>
<b>I.5.1 -Les identifications par recherche dans les banques.....</b>	<b>.....</b>	<b>358</b>
<b>I.5.2 -Mascot® .....</b>	<b>.....</b>	<b>359</b>
<b>Annexe 2 : Classification et nomenclature des enzymes .....</b>	<b>.....</b>	<b>361</b>
<b>I.6 - Recommandations .....</b>	<b>.....</b>	<b>36</b>
<b>I.7 - EC numbers .....</b>	<b>.....</b>	<b>36</b>
<b>I.8 - Les 6 grandes classes d'enzymes .....</b>	<b>.....</b>	<b>36</b>
a)	Première classe: les Oxydoréductases.....	362
b)	Deuxième classe : les Transférases .....	362
c)	Troisième classe : les Hydrolases.....	363
d)	Quatrième classe : les Lyases.....	363
e)	Cinquième classe : les Isomérases .....	364
f)	Sixième classe : les Ligases .....	364
<b>Annexe 3: Investigating the plant response to cadmium exposure by proteomic and metabolomic approaches .....</b>	<b>.....</b>	<b>365</b>
<b>INDEX DES FIGURES.....</b>	<b>.....</b>	<b>379</b>
<b>INDEX DES TABLEAUX .....</b>	<b>.....</b>	<b>382</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>.....</b>	<b>383</b>

## Index des figures

Figure 1 : Couverture de la revue scientifique Nature annonçant le séquençage du génome d' <i>Arabidopsis thaliana</i> (l'Arabette des dames)	11
Figure 2 : Diagramme de Venn représentant le croisement des jeux de données de protéomique vacuolaire issus des 4 équipes (Jaquinod et al., 2007, Shimaoka et al., 2004, Szponarski et al., 2004, Carter et al., 2004)	13
Figure 3 : Représentation schématisée d'une cellule végétale	13
Figure 4 : Représentation graphique du nombre de publication en protéomique des organites présent dans PubMed en juin 2011 classés par organisme.	13
Figure 5 : Planche de <i>Drosera rotundifolia</i> . Sources : wikimedia domaine public	18
Figure 6 : Schéma de vacuoles contractiles en phase diastolique et systolique	189
Figure 7 : Photo d'une paramécie avec deux vacuoles contractiles en phase diastolique	20
Figure 8 : Marty, 1999 _ Modèle des voies d'adressage vacuolaire.	21
Figure 9 : Transporteurs vacuolaires décrits au niveau moléculaire (A) et définis à partir de faits expérimentaux (B) (données d'électrophysiologie, transports et études de compartimentation). D'après Martinoia et al. (2007).	28
Figure 10 : Structure de l'ATPase vacuolaire de plante	30
Figure 11 : Noir et rouge de Matisse	50
Figure 12 : La desserte rouge de Matisse	50
Figure 13 : D'après Clemens, 2006 Principaux flux intra-cellulaires du cadmium, depuis son entrée dans les cellules racinaires jusqu'à sa libération dans le système vasculaire	59
Figure 14 : Synthèse des phytochélatines et des isophytochélatines.	62
Figure 15 : Schéma de l'ensemble des systèmes instrumentaux dédié à la MS, MS <sup>2</sup> , et SRM	69
Figure 16 : Profil de fragmentation du peptide IPYPEIEEVGALDDIER	70
Figure 17 : Processus d'electrospray	72
Figure 18 : Sélection des ions dans le spectromètre de masse de type QqQ en mode SRM	74
Figure 19 : Processus d'analyse <sup>14</sup> N/ <sup>15</sup> N.	75
Figure 20 : Vue schématique des méthodes de microscopie et de biochimie utilisées pour évaluer la pureté des organites.	82
Figure 21 : Schéma de l'approche globale mise en place pour permettre une analyse approfondie du protéome vacuolaire d' <i>Arabidopsis thaliana</i>	93
Figure 22 : Analyse par spectrométrie de masse de la composition protéique de la membrane de vacuoles d' <i>Arabidopsis thaliana</i>	149
Figure 23 : Répartition des protéines identifiées dans les fractions strictement tonoplastique et associée à la membrane	150
Figure 24 : Répartition des classes d'enzymes dans les deux fractions tonoplastiques	154
Figure 25 : Classification fonctionnelle des protéines identifiées dans la fraction strictement tonoplastique en fonctions du nombre de protéines identifiées ou du spectral count.	155
Figure 26 : Association protéines / membrane selon la nature des liaisons amphiphatiques	157
Figure 27 : Contributions de différents travaux de protéomique vacuolaire à l'établissement d'une liste de transporteurs tonoplastiques	158
Figure 28 : Principales classes de transporteurs identifiées dans le tonoplaste de la vacuole, classées selon l'ontologie de la Transporters classification data base (TCDB).	159

Figure 29 : Evaluation de la présence et de l'activité des protéases (Protéasome 20 S, TPP II et TOP) dans les échantillons cellulaire et vacuolaire d' <i>Arabidopsis thaliana</i> _____	172
Figure 30 : Schéma organisationnel et fonctionnel possible du protéasome et de la subtilase TPPII (tripeptidylpeptidase II) chez <i>Arabidopsis thaliana</i> . _____	174
Figure 31 : Electrophorèse bidimensionnelle de type BN / SDS-PAGE réalisée avec des échantillons membranaires de vacuoles. _____	182
Figure 32 : Séparation des protéines vacuolaires par BN-PAGE (150 µg d'échantillons vacuolaires totaux) _____	183
Figure 33 : Séparation des protéines vacuolaires par BN / SDS-PAGE (200 µg d'échantillons vacuolaires totaux) _____	184
Figure 34 : Séparation des protéines soluble associées à la membrane par BN-PAGE. _____	186
Figure 35 : Diagramme de Venn croisant les identifications réalisées dans les 3 fractions vacuolaire, le tonoplaste, les protéines associées et le soluble correspondant. _____	189
Figure 36 : Cinétique d'extraits protéique protoplastique en condition de stress oxydant ou cadmium sur électrophorèse suivi de l'incorporation de soufre 35 _____	189
Figure 37 : Cartographie de la dynamique du protéome soluble vacuolaire lors d'un stress causé par le cadmium. _____	196
Figure 38 : Méthode de culture cellulaire SILAC en vue d'analyse comparative de deux échantillons protéiques _____	201
Figure 39 : Méthode d'analyse de la technique SILAC _____	202
Figure 40 : Méthodologie résumée du processus $^{15}\text{N}$ : _____	201
Figure 41 : Design expérimental de la stratégie d'analyse $^{15}\text{N}$ _____	202
Figure 42 : Chromatogramme et spectre de masse typique d'analyse $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ _____	201
Figure 43 : Profils des massifs $^{15}\text{N}$ théoriques pour le peptide ISFLGTLIGPSPSPR avec son massif expérimental extrait depuis MassLynx® _____	204
Figure 44 : Représentation graphique des valeurs de $\chi^2$ pour 5 peptides différents. _____	205
Figure 45 : Identification $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ de l'alpha-mannosidase dans une bande de gel 1D. _____	206
Figure 46 : Exemple de delta de masse entre les paires de massifs isotopique $^{14}\text{N} / ^{15}\text{N}$ . _____	208
Figure 47 : Schéma du pipeline RMI / MIME. _____	209
Figure 48 : Visualisation VIPER des paires _____	210
Figure 49 : Pipeline d'analyse $^{14}\text{N} / ^{15}\text{N}$ mis en place avec l'utilisation des logiciels Viper & Decon2LS211	
Figure 50 : Corrélation croisée des données de protéomique vacuolaire et de transcriptomique cadmium. _____	214
Figure 51 : Captures d'écran des interfaces d'interrogation des tables proteomics (A) et microarray (B) d'ArHeS. _____	216
Figure 52 : Principe de la SRM (A) Sélection des ions dans le spectromètre de masse de type QqQ en mode SRM _____	216
Figure 53 : Sélection des peptides signatures à partir de faits expérimentaux. _____	226
Figure 54 : Peptides signatures après analyse expérimentale (en rouge) _____	227
Figure 55 : Sélection des peptides signatures in silico par digestion théorique à l'aide d'outil informatique (data base et logiciel) _____	228
Figure 56 : Peptides signatures après digestion et sélection théorique (en vert) _____	228
Figure 57 : Peptides signatures après digestion théorique et prédiction ESP (en bleu) _____	229
Figure 58 : Méthode SRM pour le peptide AAVISEEESK de la protéine PTR 2 _____	230
Figure 59 : Visualisation d'un chromatogramme du courant d'ions totaux SRM présentant un profil d'analyse multiplexe. _____	231

<b>Figure 60 : Exemple de transitions SRM de 2 peptides protéotypiques des protéines PTR2B At2g02040 et PaseB At5g44020</b>	<b>232</b>
<b>Figure 61 : Photo de suspensions de cellules d'Arabidopsis thaliana</b>	<b>307</b>
<b>Figure 62 : Schéma des repiquages successifs en condition de culture N15</b>	<b>308</b>
<b>Figure 63 : Photo de plantules d'Arabidopsis thaliana en culture in vitro</b>	<b>309</b>
<b>Figure 64 : Photo de cals racinaires d'Arabidopsis thaliana en culture in vitro</b>	<b>309</b>
<b>Figure 65 : Schéma du protocole de purification de vacuoles par la méthode du simple gradient.</b>	<b>311</b>
<b>Figure 66 : Schéma du protocole de purification de vacuoles par la méthode du double gradient.</b>	<b>312</b>
<b>Figure 67 : Schéma du principe de l'IEF / SDS-PAGE</b>	<b>319</b>
<b>Figure 68 : Schéma du principe des BN-PAGE</b>	<b>321</b>
<b>Figure 69 : Photo d'un tube de bleu de Coomassie 1X</b>	<b>322</b>
<b>Figure 70 : Copie d'écran ePims illustrant la hiérarchie des activités</b>	<b>326</b>
<b>Figure 71 : Pipeline d'analyse et de gestion des données de spectrométrie de masse. Numérotation cf. texte ci-dessus.</b>	<b>330</b>
<b>Figure 72 : Copie d'écran de l'application hEIDI illustrant les « user context »</b>	<b>331</b>
<b>Figure 73 : Item du tableau Protéothèque vacuole</b>	<b>338</b>
<b>Figure 74 : Structure de la MSIDB Organisation du contenu de la MSIDB version E1 par tables hiérarchisées.</b>	<b>342</b>
<b>Figure 75 : Représentation schématique d'une source électrospray. (Source wikimedia domaine public)</b>	<b>344</b>
<b>Figure 76 : Le modèle de Dole : L'ion en phase gazeuse est produit suite à une ultime fission coulombienne. D'après Dole et al., 1968</b>	<b>3466</b>
<b>Figure 77 : Le modèle d'Iribarne et Thomson. Le champ électrique à la surface de la goutte est si intense que l'ion est extrait par désorption de champ. D'après Iribarne et Thomson, 1976</b>	<b>347</b>
<b>Figure 78 : Géométrie de l'Orbitrap. Equipotentiels du champ quadralogarithmique ; exemple de trajectoire d'ion stable. Source : <a href="http://planetorbitrap.com/technology.php">http://planetorbitrap.com/technology.php</a></b>	<b>350</b>
<b>Figure 79 : Schéma d'un analyseur quadripolaire. (Source wikimedia domaine public)</b>	<b>351</b>
<b>Figure 80 : Droites de fonctionnement d'un analyseur quadripolaire sur la première zone de stabilité. D'après De Hoffmann et al., 1994.</b>	<b>352</b>
<b>Figure 81 : Schéma et photographie d'un analyseur de type trappe ionique : Il est constitué d'une électrode centrale circulaire en forme de diabololo (électrode annulaire), couverte de deux calottes hémisphériques (électrodes end-cap).</b>	<b>353</b>
<b>Figure 82 : Nomenclature des ions issus de la fragmentation peptidique par spectrométrie de masse en tandem</b>	<b>356</b>
<b>Figure 83 : Significativité du seuil d'homologie. Le score du peptide marqué par une flèche se distingue de la distribution de scores des autres peptides</b>	<b>360</b>

## **Index des tableaux**

<b>Tableau I : Sous unités-de l'ATPase vacuolaire.</b>	<b>160</b>
<b>Tableau II : Transporteurs ABC identifiés dans la fraction membranaire de la vacuole.</b>	<b>162</b>
<b>Tableau III : Tonoplast Intrinsic Proteins (TIP) identifiées par nos travaux.</b>	<b>163</b>
<b>Tableau IV : Protéines à domaine SPFH identifiées dans la vacuole.</b>	<b>169</b>
<b>Tableau V : Résultats d'identification vacuole membranaire du Shave and Conquer.</b>	<b>177</b>
<b>Tableau VI : Sélection de 52 protéines vacuolaires codées par des gènes dont le niveau d'accumulation de transcrits est régulé lors d'un stress cadmium.</b>	<b>217</b>
<b>Tableau VII : Résultats des expériences de dosages SRM pour les 52 protéines vacuolaires codées par des gènes dont le niveau d'accumulation de transcrits est régulé lors d'un stress cadmium.</b>	<b>236</b>
<b>Tableau VIII : Liste complète des 504 protéines identifiées dans la fraction soluble classées par appartenance à leur famille de protéines.</b>	<b>250</b>
<b>Tableau IX : Liste complète des 1084 protéines identifiées dans la fraction membranaire classées par appartenance à leur famille de protéines.</b>	<b>269</b>



## Glossaire

AAAP	Amino Acid / Auxin Permease
ABC	ATP Binding Cassette
APC	Amino acid – Polyamine - organoCation
BN	Blue Native
CAX	CAtion Exchanger
CCD1	Carotenoid Cleavage enzyme D1
CDF	Cation Diffusion Facilitator
CLC	Chloride chanel
COPT	Copper Transporter
CPA	monovalent Cation / Proton Antiporter
CTR2	Copper Transporter
DMT	Drug / Metabolite Transporter
DTT	1,4-DiThioTréitol
EDTA	acide Ethylène-Diamine-TétraAcétique
ESI	Electrospray Ionisation
ENT	Equilibrative Nucleoside Transporter
GFP	Green Fluorescent Protein
H <sup>+</sup> -PPase	PyroPhosphatase
HEPES	Acide (4-(2-HydroxyEthyl)-1-PiperazineEthaneSulfonic
HTML	HyperText Markup Language ( <i>langage de programmation informatique</i> )
IEF	Isoelectrofocalisation
KUP	K <sup>+</sup> Uptake Permease
LCT	Low affinity Cation Transporter
MATE	Multidrug And Toxin Extrusion
MC	Mitochondrial Carrier
MDR	MultiDrug Resistance protein
MES	2-(N-Morpholino)EthaneSulfonic acid
MFS	Major Facilitator Superfamily

MOP	Multidrug / Oligosaccharidyl-lipid / Polysaccharide
MPP	Mitochondrial and Plastid Porin
MPT	Mitochondrial Protein Translocase
MRP	Multidrug Resistance – associated Protein
MS	Mass Spectrometry ↔ Spectrométrie de masse
NAP	Non-intrinsic ABC Protein
Nramp	Natural resistance – associated macrophage protein
OPT	OligoPeptide Transporters
P-ATPase	ATPase de type P (plasmalemmique)
PAGE	PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
PC	Phytochélatine
PDR	Pleiotropic Drug Resistance
POT	Proton-dependent Oligopeptide Transporters
RND	Resistance / Nodulation / Division
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SPFH	Stomatin Prohibitin Flotilin Hbc
SQL	Structured Query Language ↔ Langage d'administration et de requêtes
SRM	Selected Reaction Monitoring
TAP	Transporter associated with Antigen Processing
TCA	acide TriChloroAcétique
TGS	Tris Glycine SDS
TIP	Tonoplast Intrinsic Protein
TMD	TransMembrane Domain ↔ Domaine trans-membranaire
TOM	Translocase of the Outer membrane of the Mitochondria
UNC	Unclassified
V-ATPase	ATPase de type V (vacuolaire)
VIC	Voltage-gated Ion Channel
YSL	Yellow Stripe Like
ZIP	Zinc / Iron Permease



## Préambule

Ma thèse s'intitule « Caractérisation du protéome vacuolaire de la plante modèle *Arabidopsis thaliana* et étude de son rôle dans la détoxification d'un métal lourd, le cadmium ». *Arabidopsis thaliana* est une plante modèle des plantes supérieures de type dicotylédones. Cette espèce vivante est représentative de la taxonomie des *magnoliophyta*, les plantes à fleurs. Elle est cultivée en laboratoire sous forme de lignées cellulaires ou de plantules. Le cycle de vie chez *Arabidopsis thaliana* est court, 6 semaines sont suffisantes pour passer de la germination à la plante mature. Cette petite plante est passée de l'anonymat des talus d'*Arabis* à star des paillasses depuis 2000 en faisant la couverture de Nature (Figure 1).



**Figure 1 : Couverture de la revue scientifique Nature annonçant le séquençage du génome d'*Arabidopsis thaliana* (l'Arabette des dames)** Source : *Nature* 408, 820-823 (14 décembre 2000)

Elle possède le plus petit génome des plantes supérieures séquencées, estimé à environ 27 000 gènes (125 Mb à 157 Mb) regroupés sur 5 chromosomes (Bennett *et al.*, 2003). Par comparaison, le riz et le maïs ont un génome respectivement 4 et 20 fois plus grand. L'absence d'intérêts économiques particuliers chez cette espèce favorise l'échange des données entre les équipes de recherche. De nombreux mutants ont été caractérisés et isolés, elle a ainsi été qualifiée de "*Drosophila* for the plant kingdom" (Crow, Dove & Fink, 1998 et références associées). L'ensemble des gènes d'un organisme constitue son génome, de la même façon que le protéome est constitué de l'ensemble des protéines d'une cellule ou d'un tissu. Alors que le génome reste constant dans les cellules d'un même organisme et au cours de la vie de la cellule, le protéome change en réponse aux différentes conditions de vie de la cellule. Les données du séquençage génomique, ainsi que la masse critique d'information mises à disposition par la communauté scientifique

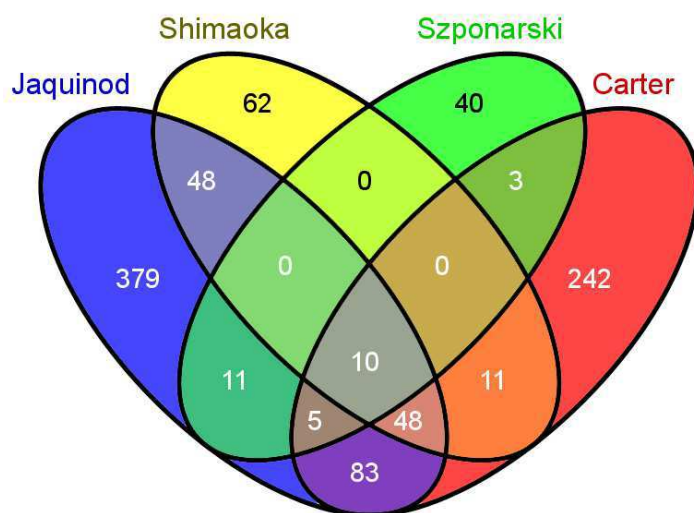
font d'*Arabidopsis thaliana* un modèle de premier choix lorsque l'on souhaite réaliser une étude protéomique. Dans le cas de ma thèse, il s'agit plus particulièrement d'une analyse protéomique d'un organe : la vacuole. La détermination du protéome d'un organe permet de décrire le contenu en protéines d'un compartiment cellulaire, dans une condition donnée, ainsi

que les variations quantitatives et qualitatives au cours de divers processus et réponses cellulaires.

L'équipe « Réponse de la Plante aux Stress Environnementaux et Métaux Lourds » sous la direction de Jacques Bourguignon du laboratoire de Physiologie Cellulaire et Végétale (UMR 5168, CNRS INRA UJF CEA, à Grenoble) s'attache à comprendre la réponse globale de la plante face à différents métaux lourds et aux radionucléides. Dans le cadre des projets de Toxicologie Nucléaire (ToxNuc) développés par le CEA, l'équipe a choisi d'étudier les mécanismes de détoxification cellulaire mis en place chez *Arabidopsis thaliana* face à un polluant majeur, le cadmium (Cd). Les activités industrielles et urbaines sont génératrices d'un grand nombre de polluants, et bien que naturellement présent dans l'environnement, les rejets anthropiques de cadmium sont estimés à 68 tonnes annuelles en France. Cette pollution a un effet sur la santé humaine *via* la chaîne alimentaire dont le premier de ses maillons est constitué par les végétaux (Ishihara *et al.*, 2001). Les inquiétudes de la société face à l'altération de la qualité de l'environnement évoluent et s'accroissent depuis plusieurs années. Ces préoccupations motivent le besoin de mieux connaître les effets toxiques de ces polluants afin d'en contrôler et d'en limiter la nocivité.

Chez les plantes, contrairement aux animaux, des mécanismes de compartimentation cellulaire des métaux lourds existent (Clemens, 2006). La vacuole a été identifiée comme le site privilégié de cette détoxification (Hall, 2002). Afin de mieux comprendre les mécanismes du trafic cellulaire, les processus de transport des substrats vacuolaires à travers le tonoplaste, le stockage des métabolites et leur dégradation, l'équipe de Jacques Bourguignon a initié une analyse globale du protéome vacuolaire. Ce projet d'analyse protéomique s'est établi grâce à une collaboration avec Michel Jaquinod et l'équipe de l'Etude de la Dynamique des Protéomes (EDyP) du laboratoire de Biologie à Grande Echelle (U1038, INSERM UJF CEA). À l'initiation de leur travaux, aucune analyse globale du protéome vacuolaire végétal n'avait été réalisée, trois équipes ont presque simultanément publié des résultats de protéomique vacuolaire d'*Arabidopsis thaliana* (Szponarski *et al.*, 2004; Shimaoka *et al.*, 2004; Carter *et al.*, 2004). Deux des trois analyses publiées ne concernent que la fraction membranaire (Szponarski *et al.*, 2004; Shimaoka *et al.*, 2004). L'identification des protéines solubles de la vacuole provenait exclusivement des travaux de Carter *et al.*, réalisés sur des protoplastes isolés à partir de feuilles. Notre équipe a quant à elle choisi de réaliser une caractérisation des protéomes membranaire et soluble à partir de cellules d'*Arabidopsis* en culture. En 2006, en combinant des méthodes de fractionnement et d'analyses par spectrométrie de masse, 584 protéines de la

fraction membranaire ont été identifiées. Parmi les 584 protéines, 195 ont été classifiées comme intrinsèques à la membrane en se basant sur la présence d'un ou plusieurs domaine(s) transmembranaire(s) prédit(s) et 91 ont été identifiées comme de possibles transporteurs et ont fait l'objet d'une analyse plus détaillée (Jaquinod *et al.*, 2007). La Figure 2 représente les recouvrements entre les identifications protéiques de ces 4 études complémentaires.



**Figure 2 :** Diagramme de Venn représentant le croisement des jeux de données de protéomique vacuolaire issus des 4 équipes (Jaquinod *et al.*, 2007, Shimaoka *et al.*, 2004, Szponarski *et al.*, 2004, Carter *et al.*, 2004)

Le protéome vacuolaire représentant moins de 3 % du total protéique cellulaire (Lilley and Dupree 2007) et la purification de ces organites étant relativement délicate, ce n'est que tardivement, comparé aux autres organites, que des analyses protéomiques vacuolaires ont été mises en place (Szponarski *et al.*, 2004 ; Shimaoka *et al.*, 2004 ; Carter *et al.*, 2004 ; Endler *et al.*, 2006 ; Schmidt *et al.*, 2007 ; Jaquinod *et al.*, 2006). L'étude protéomique de la vacuole reste malgré tout compliquée, en raison de l'implication de la vacuole dans les processus de dégradation cellulaire. Cet organite joue un rôle essentiel dans le renouvellement des protéines et à travers l'autophagie du cytoplasme et des autres organites (notamment pendant la sénescence, les carences, et les processus de croissance). Il est alors difficile de faire la distinction entre les véritables protéines résidentes de l'organite et les protéines 'contaminantes'.

Dans le but d'identifier les protéines d'origine vacuolaire impliquées dans la détoxification du cadmium, mon travail de thèse a consisté à étudier de manière approfondie le protéome de la vacuole. La récente connaissance du protéome vacuolaire est probablement à l'origine du manque d'information concernant les mécanismes de séquestration vacuolaire du cadmium. Si les étapes cytosoliques ont été identifiées, celles impliquant directement la vacuole restent à éclaircir. Les fonctions métaboliques de la vacuole végétale sont relativement bien

décrites dans la littérature (Clemens 2006, Villiers *et al.*, 2011). Par contre les protéines impliquées dans ces mécanismes ne sont pas clairement identifiées.

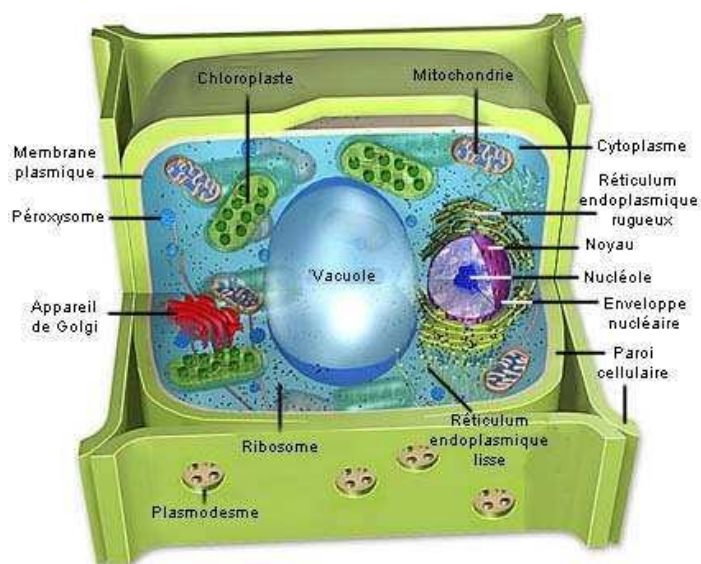
L'obtention de vacuoles intactes et exemptes de contaminants est une condition nécessaire à la mise en place d'analyses protéomiques. Une partie de mon travail a donc nécessité de préparer des vacuoles purifiées sur un gradient de densité de Ficoll à partir de protoplastes isolés de cellules d'*Arabidopsis thaliana* en culture d'après le protocole de Jaquinod *et al.* (2007). Une partie de ces purifications de vacuoles a été utilisée pour réaliser des électrophorèses (SDS-PAGE), des « Blue native » gels (BN/SDS-PAGE) afin de déterminer par spectrométrie de masse la composition et les associations protéiques vacuolaires. Une base de données protéomique a été élaborée pour cette étude. Ces analyses avaient non seulement pour but d'établir une liste des protéines vacuolaires la plus exhaustive possible, mais également de mettre en place des outils et des méthodes d'analyse destinés à suivre l'évolution qualitative et quantitative du protéome. Une méthode d'analyse protéomique avec marquage a été mise en place afin de caractériser des marqueurs protéiques spécifiques d'un stress causé par un ion métallique. Le protéome de cellules végétales saines est comparé à celui de cellules stressées par du cadmium. Cette comparaison a conduit à l'identification d'acteurs potentiels de la signalisation cellulaire engagés lors d'un stress provoqué par le cadmium.

La synthèse bibliographique présentée décrit les connaissances actuelles des fonctions vacuolaires dans une première partie, et celles de la réponse végétale au stress métallique dans une seconde partie. Cette représentation de la vacuole a déterminé la méthodologie protéomique mise en place. L'état de l'art en matière de protéomique est brièvement décrit dans une troisième partie. Enfin, dans une dernière partie sont présentés les objectifs que nous nous sommes fixés.

# Introduction

<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>13</b>
<b>I - LA VACUOLE .....</b>	<b>14</b>
<b>II - LES FONCTIONS DE LA VACUOLE VEGETALE.....</b>	<b>21</b>
<b>III - POURQUOI S'INTERESSER AU CADMIUM ? .....</b>	<b>42</b>
<b>IV - LE STRESS CADMIUM CHEZ LES PLANTES.....</b>	<b>48</b>
<b>V - ETUDE PROTEOMIQUE.....</b>	<b>57</b>
<b>VI - LES OBJECTIFS DE LA THESE.....</b>	<b>85</b>

Les **organites** sont des compartiments intracellulaires structurés entourés d'une ou plusieurs membrane(s). Au cœur des cellules, plusieurs organites peuvent être distingués, l'une des différences frappantes entre les cellules végétales et animales est la présence chez les plantes de **plastides** et de **vacuole** (Figure 3). À chacun des organites, des fonctions cellulaires spécifiques sont attribuées, par exemple, la mitochondrie est pourvoyeuse d'énergie sous forme d'ATP et le chloroplaste est le centre de la photosynthèse. Les organites suivants : le réticulum endoplasmique (ER), le dictyosome ou appareil de Golgi (Golgi), les peroxyosomes (Pex), les



**Figure 3 : Représentation schématisée d'une cellule végétale** Source : wikimedia domaine public

vésicules endosomales et lysosomes (EE), la membrane plasmique (PM) et la vacuole (V) peuvent être définis comme des territoires fonctionnels. Ils sont impliqués dans le système **endosomal** (ER, Golgi, Pex, EE, PM et V) et le système **lytique** (Pex, EE, V). La spécificité de fonction de ces organites dépend de la composition protéique de chacun. C'est là que la **protéomique des organelles** intervient, puisqu'elle va permettre d'identifier les protéines présentes dans ces organites pour une période du cycle de vie cellulaire.

Le but de mon travail de thèse fut en premier lieu de caractériser le protéome d'un organe particulier, la vacuole chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana*.

# ***I - La Vacuole***

Terme issu du latin, *vacuus* « vide, inoccupé », signifiant petite cavité

## ***I.1 - Introduction historique***

L'histoire de la découverte de la vacuole (De, 2000 et références associées) s'inscrit dans le sillage de la **Théorie cellulaire** et de l'avènement du microscope (A. Van Leeuwenhoek et R. Hooke). En 1838, la Théorie cellulaire définit que « Tous les organismes vivants sont faits de petites unités : les cellules » (M.J. Schleiden et T. Schwann). Entre 1841 et 1845, F. Dujardin (biologiste français / 1801-1860) est le premier à employer le terme vacuole pour désigner de larges emplacements cellulaires **aqueux** entourés d'une membrane. C'est Schleiden (botaniste allemand / 1804-1881) en 1842 qui fait la distinction entre cytoplasme et vacuole. Puis en 1855, K.W. Von Nägeli (botaniste suisse / 1817-1891) est le premier à établir que les vacuoles sont des composantes morphologiques constitutives des cellules végétales, qu'elles peuvent **dissoudre** des substances à des concentrations supérieures au milieu environnant et sont capables de **plasmolyse**. Trente ans plus tard, les travaux de H. De Vries (botaniste hollandais / 1848-1935) constituent une avancée importante dans la compréhension des mécanismes impliqués dans la **turgescence** des cellules par des observations de tentacules de *Drosera rotundifolia* (Figure 4).



Figure 4 A : Photo de *Drosera rotundifolia* dans son milieu naturel : la tourbière



Figure 4 B : Photo d'une « feuille » de *Drosera rotundifolia* avec ses tentacules rosés

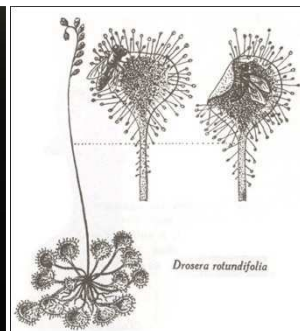


Figure 4 C : Dessin d'observation d'une *Drosera rotundifolia*

**Figure 4 : Planche de *Drosera rotundifolia*.** Sources : wikimedia domaine public

En 1884, les travaux de De Vries démontrent que la **membrane** qui entoure la vacuole, qu'il nomme 'tonoplaste'<sup>1</sup>, est **semi-perméable**. Les solutés actifs de l'équilibre osmotique sont les acides organiques, les sucres et les sels inorganiques tels que le  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  ou  $\text{K}^{+}$ . Les

<sup>1</sup> Tonoplaste est un terme composé issu de grec, *tono* « tension » et du latin, *plasma* « forme façonnée », signifiant forme façonnée par la tension.

étudiants qui lui succédèrent ont prouvés que les vacuoles peuvent fusionner entre elles et sont impliquées dans divers processus cellulaires (De, 2000 et références associées).

**Aujourd'hui**, la vacuole végétale est définie comme un organite cellulaire délimité par une simple membrane appelée **tonoplaste**, qui contient un milieu acide, le **suc vacuolaire**. Dans la majorité des cas, le pH vacuolaire est compris entre 5,0 et 5,5. Il peut parfois être plus **acide** et évoluer au cours du développement comme lors de la maturation du citron où le pH peut varier de 6,2 à 2,2. La vacuole occupe en moyenne 30% du **volume** cellulaire végétal et peut occuper jusqu'à 90% de ce volume dans le cas des cellules matures telles que les cellules épithéliales (De, 2000).

## **I.2 - Les vacuoles dans le monde du vivant**

### **I.2.1 - Occurrence des vacuoles**

Les vacuoles sont présentes **uniquement chez les eucaryotes** qu'il s'agisse d'organismes **unicellulaires ou pluricellulaires**. La distribution de ces vacuoles, leurs structures, aspects, et fonctions sont hétérogènes. D'une manière générale, ces vacuoles sont très **diverses**, et sont présentes en un ou plusieurs exemplaires, bien que certaines cellules plus spécialisées (spores ou zygotes par exemple) puissent en être dépourvues. Elles sont également hétérogènes en termes de taille, et peuvent aussi bien correspondre à plus de 90 % du volume cellulaire qu'être difficilement détectables sous un microscope.

### **I.2.2 - Distribution des vacuoles chez les eucaryotes**

En termes de phylogénie, les organismes les plus ancestraux chez lesquels on observe des vacuoles sont les algues. Les algues présentent des vacuoles avec une diversité de formes et de tailles identiques aux champignons (De, 2001). Au sein de ce règne, les **levures** (*Ascomycètes* et *Basidiomycètes*) contiennent des vacuoles relativement **comparables** à celles des vacuoles des **plantes supérieures** et, à ce titre, les levures sont souvent utilisées dans l'étude des fonctions des vacuoles végétales (Schneider *et al.*, 2008 ; Kawachi *et al.*, 2008). Elles se distinguent néanmoins par leur propriété unique de ségrégation lors de la division cellulaire (Conradt *et al.*, 1992), permettant à la vacuole de la cellule mère de se répartir entre les deux cellules filles.

Chez les bryophytes (mousses) et ptéridophytes (fougères), la vacuole est ubiquitaire, à l'exception d'un seul type cellulaire, les gamètes mâles (anthérozoïdes). Cela peut s'expliquer par une reproduction sexuée en milieu aqueux. À l'inverse, chez les **gymnospermes** (plantes à graines – cônes), chez lesquels toutes les cellules présentent une ou plusieurs vacuole(s), la vacuole participe à l'élargissement des ovules et permet une meilleure diffusion anémochore<sup>2</sup> des pollens (excepté le genre *Welwitschia*).

Chez les **angiospermes** (*Magnoliophyta* ou plantes à fleurs), la plupart des cellules différenciées présente une large vacuole centrale, qui remplit l'ensemble des fonctions métaboliques propres à cet organe. Il existe cependant des exemples pour lesquels on retrouve la coexistence de différents types de vacuoles (confère II.3.2 Structure).

### **I.3 - Composition et origine**

#### **I.3.1 - Biogenèse**

Les protéines vacuolaires sont codées par des **gènes nucléaires**, synthétisées dans le cytoplasme puis importées à travers le tonoplaste. Le tonoplaste est issu du système endomembranaire sécrétoire.

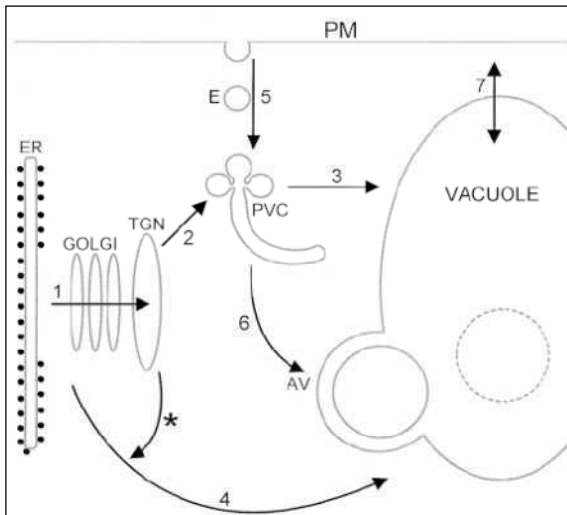
##### **I.3.1.1 - Réseau vacuolaire**

---

<sup>2</sup> **Anémochorie** = mode de pollinisation passif qui consiste en la dispersion des pollens grâce au vent. Les graminées et les arbres sont concernés par ce mode de pollinisation.



Dans les cellules indifférenciées, des vacuoles de très petites tailles sont observées, elles sont appelées **provacuoles** ou réseau prévacuolaire (*prevacuolar compartments* - PVC). Marty (1999) a décrit un modèle de biogenèse, maintenance et remplissage de la vacuole par **cinq voies différentes** (Figure 5). Le premier parcours (flèches 1, 2, 3) débute, au niveau des premières étapes des voies de sécrétion des protéines, par un acheminement du réticulum



endoplasmique (ER) vers le Golgi, puis vers le réseau trans golgien (TGN). Le tri des protéines vacuolaires aurait lieu au niveau du TGN vers un compartiment pré-vacuolaire de biosynthèse tardive des protéines vacuolaires. Des vésicules ou des travées bourgeonneraient du PVC pour fusionner avec la vacuole. Cette voie est aussi souvent citée dans la littérature sous le nom de **voie dépendante du PVC** (*VPS-dependant* ou *CYP pathway*). Le second parcours (4) ou **voie**

**alternative** (*ALP pathway*) commence, dès le début de la voie de sécrétion, par un transport direct à partir du ER avec une accumulation de matière possible venant de l'appareil de Golgi (indiqué par un astérisque).

Le troisième parcours (5) d'adressage des protéines vacuolaires emprunterait la **voie endosomale**. Le quatrième parcours (6) s'effectuerait par autophagie du cytoplasme vers la vacuole centrale par des voies de dégradation, de biosynthèse ou par absorption de portion du cytosol dans une membrane PVC. Elle est appelée **voie directe cytosol-à-vacuole** (*Cvt pathway*). Enfin, le dernier parcours (7) correspond aux transports d'ions et de solutés **directement à travers le tonoplaste**.

### I.3.1.2 - Évolution de la vacuole au cours de la différenciation cellulaire

Au niveau des zones méristématiques, les cellules indifférenciées contiennent de nombreuses petites vacuoles, c'est le réseau prévacuolaire.

**Figure 5 : Marty, 1999 \_ Modèle des voies d'adressage vacuolaire.** Source: The Plant Cell, Vol. 11, 587-599, April 1999.

Au niveau des zones d'élongations, les cellules différenciées s'allongent, les vacuoles fusionnent pour former une vacuole

centrale.

### I.3.2 - Structure

Les cellules végétales contiennent une grande diversité **de vacuoles différenciées et spécialisées selon les tissus** ou les organes dans lesquels elles sont présentes. Par exemple, chez la canne à sucre et la betterave, il y a une accumulation massive de saccharose. Dans les fruits et les pétales de fleurs, on observe des accumulations importantes de pigments. Au niveau des feuilles, les cellules stomatiques présentent de larges vacuoles avec des phénomènes dynamiques de plasmolyse et de turgescence afin que les stomates s'ouvrent et se ferment.

Une seule cellule peut également contenir 2 ou plusieurs types de vacuoles. Deux grands types de vacuoles sont communément distingués : les **vacuoles lytiques** (*Lytic Vacuole*, LV) et les **vacuoles de stockage protéique** (*Protein Storage Vacuole*, PSV). Les équipes de Jiang & Rogers ont ainsi montré qu'il existe deux voies fonctionnelles de transport vésiculaire des protéines vers ces 2 types de vacuoles (Jiang *et al.*, 1998 et 2002.). Cette distinction est avérée chez certaines cellules, pour lesquelles des marqueurs tonoplastiques spécifiques ont été identifiés (Jauh *et al.*, 1999), mais reste indéterminée pour d'autres types cellulaires (Olbrich *et al.*, 2007 ; Hunter *et al.*, 2007 ; Rogers, 2008). Les PSV contiennent majoritairement des  $\alpha$ -TIP au lieu de  $\gamma$ -TIP qui sont caractéristiques des LV. Les protéines **TIP** (*Tonoplast Intrinsic Protein*- Aquaporines) sont spécifiques des membranes vacuolaires et sont reconnues comme des **marqueurs** moléculaires des vacuoles (Jauh *et al.*, 1999 ; Moriyasu *et al.*, 2003).

#### I.3.2.1 - PSV : les vacuoles de stockage protéique

Les PSV sont majoritairement présentes dans les **cellules végétatives** (racines, parenchyme des tiges, tubercules, cosses) et **génératives** (endospermes, mésophylles des cotylédons, axes embryonnaires). Les feuilles, fruits et graines sont des sites de dépôt des protéines de réserve à plus ou moins long terme. Au niveau des graines, ces **protéines** seront mobilisées lors de la germination. C'est par exemple le cas des cellules à aleurones<sup>3</sup> des graines d'orge (Bethke *et al.*, 1996), qui accumulent des quantités importantes de protéines dans ces vacuoles de stockage, et les protéases chargées de leur dégradation dans d'autres vacuoles.

#### I.3.2.2 - LV : les vacuoles lytiques

Les LV sont caractérisées par un haut pourcentage d'**hydrolases** telles que les protéases, glucosidases, myrosinases, invertases, RNases, glucanases, chitinases aussi bien que des inhibiteurs de protéases et des lectines. Ces protéines sont autant d'indices qui permettent de déduire les principales fonctions des LV. Elles sont essentielles dans le turnover des

---

<sup>3</sup> Les grains d'aleurone sont des corps protéiques amorphes ou cristallins présents dans les PSV déshydratées.

macromolécules biologiques et jouent une part importante dans les mécanismes de défense contre les pathogènes et les herbivores.

Les LV sont souvent désignées comme la **vacuole centrale** multifonctionnelle. Elles sont capables de réaliser des activités de biosynthèse ainsi que de multiples fonctions grâce à la présence de transporteurs variés au niveau du tonoplaste (Vitale & Raikhel, 1999).

#### I.3.2.3 - Conversion LV-PSV et inversement

L'évolution du compartiment vacuolaire dépend du développement et de l'environnement des plantes. Les **remaniements** les mieux connus sont la réorganisation de PSV à partir de LV lors de la formation des **graines** et inversement lors de la germination et de la croissance des graines. La transformation d'un type de vacuole en un autre type de vacuole entraîne une adaptation du compartiment vacuolaire à ces différentes fonctions. Deux théories sont discutées. Dans la première, les vacuoles préexistantes subissent des changements structuraux et fonctionnels. Dans la seconde, de nouvelles vacuoles sont formées et vont remplacer les précédentes. Dans les deux cas, cela implique une élimination protéolytique accompagnée d'une insertion de nouvelles protéines spécifiques. Durant la transformation LV-PSV, les  $\gamma$ -TIP sont substituées aux  $\alpha$ -TIP et des protéines de réserve s'accumulent dans le lumen vacuolaire (Muntz, 2007).

### I.3.3 - Composition

La composition des vacuoles évolue au cours du développement et des effets environnementaux. Pour renouveler et **adapter le pool de protéines** en réponse à ces changements, de nouvelles protéines sont importées depuis le système sécrétoire. La vaste famille d'enzymes présentes dans les vacuoles va dégrader les protéines exportées, après un temps plus ou moins long de stockage et ainsi permettre le **recyclage** des acides aminés qui les composent. Le **tonoplaste**, quant à lui, est décrit comme une bicouche lipidique très fluide qui contient très peu de protéines et de stérols. Sa composition lipidique serait un équilibre de 60-70 % de **lipides neutres**<sup>4</sup> pour 30-40 % de **phospholipides**<sup>5</sup> (De, 2000). Comme c'est le cas dans le lysosome, les structures glucidiques des protéines tonoplastiques sont tournées vers l'intérieur de la vacuole. Parmi les protéines membranaires intrinsèques remarquables, les

---

<sup>4</sup> Lipides neutres : lipides simples encore appelés homolipides. Ce sont des esters d'acides gras (comme le glycérol) que l'on classe selon leur fonction alcool. Ils sont neutres et très hydrophobes, quasi insoluble.

<sup>5</sup> Phospholipide : lipides amphiphiles formés de 2 acides gras joints par un glycérol et surmontés d'un groupement phosphate. Ils sont chargés et mobiles.

aquaporines (TIP) sont des canaux sélectifs pour l'eau caractéristiques de cet organite (De, 2000).

Le contenu des vacuoles est riche et varié en acides carboxyliques, glucides, composés du métabolisme secondaire (calcium, pigments, tannins, alcaloïdes ...), mais moindre en acides aminés et protéines, ce que nous aborderons plus en détails dans la partie « fonction de la vacuole ».

### **I.3.4 - Adressage protéique**

Il existerait deux voies distinctes d'adressage protéique vacuolaire, dirigées vers les LV ou les PSV. Les protéines solubles des LV seraient transportées dans des **vésicules** recouvertes de clathrines (*clathrin-coated vesicles*, CCV) alors que les protéines de stockage des PSV emprunteraient une voie vésiculaire séparée dans des vésicules lisses et denses (Hinz et al, 1995 ; Hohl et al, 1996 ; Okita et Rogers, 1996).

Les protéines solubles sortant de l'appareil de Golgi qui ne possèdent pas de séquence d'adressage (ou tag) sont sécrétées dans l'espace extracellulaire (Sanderfoot & Raikhel, 1999). Les protéines solubles et membranaires à destinée vacuolaire commencent leur acheminement en passant par la voie de sécrétion. Trois types de **signaux de tri vacuolaire** (*Vacuolar Sorting Signals* - VSS) ont été décrits (Chrispeels & Raikhel, 1992). Le NTPP est un propeptide situé en N-terminal de certaines protéines vacuolaires (par exemple, sporamin et aleurain), le CTPP est un propeptide situé en C-terminal (par exemple, la lectine d'orge, phaséoline, chitinase du tabac et l'albumine 2S de la noix du Brésil). Le dernier type de signal d'adressage des protéines vacuolaire est une séquence signal présente dans une zone centrale et exposée de la protéine mature (par exemple, la phytohémagglutinine et légumine).

### **I.3.5 - Conclusion sur la composition et l'origine des vacuoles**

Les vacuoles présentent des homologues de structure et de composition chimique avec les organelles à simple membrane, c'est-à-dire ER, Golgi et lysosome majoritairement, avec lesquels les vacuoles partagent une biogenèse commune. Cependant, elles se différencient de ces derniers par un panel de fonctions uniques et indispensables à l'homéostasie<sup>6</sup> cellulaire.

---

<sup>6</sup> Homéostasie (Terme issu du grec, homoios « similaire » et histēmi « immobile » signifiant état stable). Le concept fut initialement élaboré et défini par Claude Bernard. L'homéostasie est un processus physiologique permettant à un système (organisme, cellules ...) de conserver son équilibre de fonctionnement en dépit des contraintes qui lui sont extérieures.

## II - Les fonctions de la vacuole végétale

La vacuole végétale a premièrement été décrite comme un lieu de stockage de l'eau et une gardienne du maintien de la pression de turgescence. Souvent assimilée à un organe uniquement dédié au stockage de divers composés de réserve ou potentiellement gênant pour la cellule, elle est aussi comparée au lysosome des cellules animales pour ses activités lytiques. On ne peut pas définir la principale fonction de la vacuole, mais de multiples fonctions essentielles à l'homéostasie de la plante puisqu'elle est impliquée dans la croissance, le développement et la réponse aux stress. Ainsi, la vacuole permet le **stockage de nombreux métabolites** essentiels tels que l'eau, les ions inorganiques, les acides aminés et acides organiques, les sucres, et autres composés solubles et insolubles ; en particulier les pigments. Le **pH et l'homéostasie ionique sont régulés** *via* la rétention des solutés ou ions et éventuellement leur libération dans le cytosol. La vacuole est impliquée dans le **turnover** de nombreux éléments cellulaires allant des protéines jusqu'aux organites, ainsi que dans des voies de **biosynthèse** spécifiques. La présence d'enzymes dans les vacuoles, telles que des protéases, des nucléases, des glycosidases et lipases, permet la **dégradation et le recyclage** d'un grand nombre de composants cellulaires. La vacuole a également un rôle prépondérant dans la **protection** de la cellule en excluant les composés qui pourraient interférer dans le bon fonctionnement des voies métaboliques s'ils étaient en excès ou inappropriés. Elle permet aussi le stockage et la dégradation de xénobiotiques, ainsi que la séquestration des composés toxiques (toxines, ions métalliques, etc.).

### II.1 - Transporteurs impliqués dans ses fonctions

Les fonctions décrites, très diverses, nécessitent la présence, au niveau du tonoplaste, de **transporteurs spécifiques** permettant la translocation des ions et des métabolites, vers ou depuis la vacuole. Si cette membrane vacuolaire est effectivement pauvre en protéines, ces transporteurs doivent posséder une capacité de régulation et une dynamique efficaces, ou encore un turnover très rapide.

Deux types de transport permettent d'assurer les flux métaboliques et ioniques à travers le tonoplaste : le **transport passif**, indépendant de toute forme d'énergie autre que le gradient électro-chimique de l'élément transporté, et le **transport actif**, qui nécessite une dépense énergétique pour que le soluté suive un trajet thermodynamiquement défavorable. Dans le cas de la vacuole, l'énergie se présente sous forme d'ATP<sup>7</sup> ou de PPi<sup>8</sup>, qu'ils soient utilisés de façon

<sup>7</sup> ATP : L'adénosine triphosphate (ATP) est un ester d'acide triphosphorique qui catalyse de nombreuses réactions biologiques, où il intervient pour favoriser thermodynamiquement les réactions biochimiques de l'anabolisme par hydrolyse en ADP + Pi.

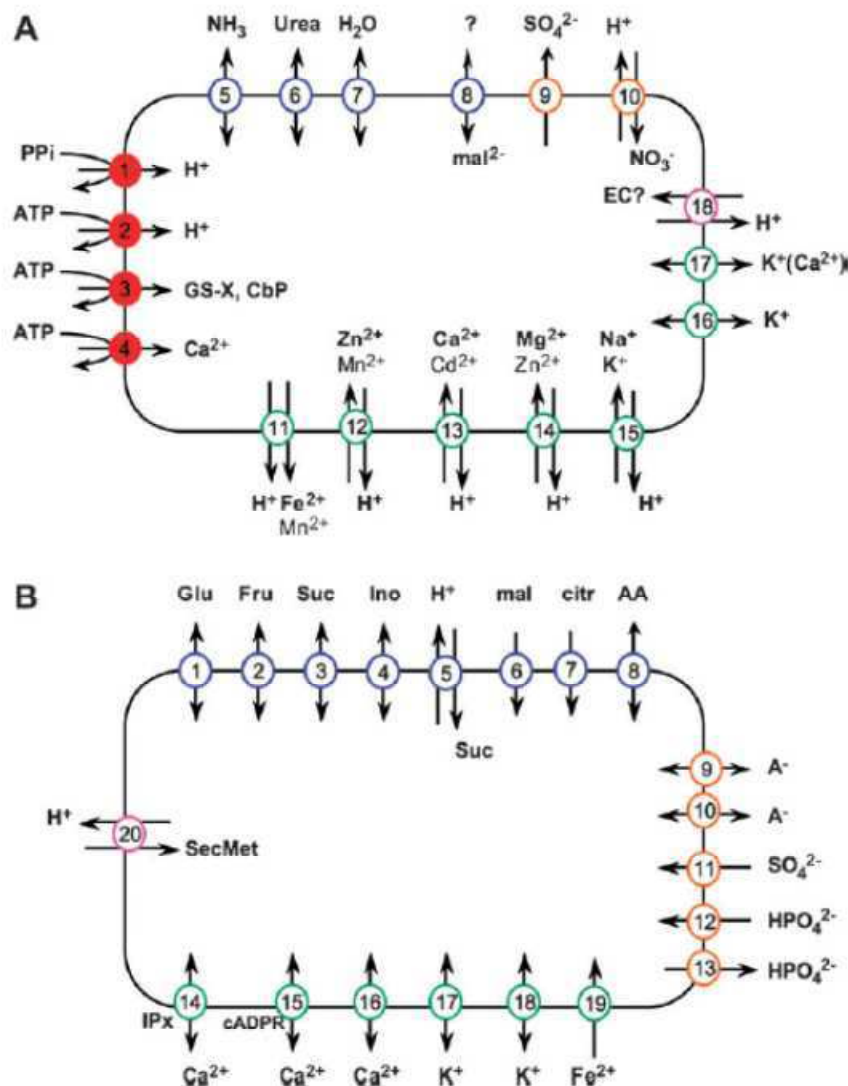
<sup>8</sup> PPi : Le pyrophosphate est un anion aussi appelé diphosphate, constitué de deux molécules de phosphates condensées autour d'une liaison P-O-P de type anhydride acide (formule semi-développée (O3P)-O-(PO3)4-).

directe, *via* leur hydrolyse, ou indirecte *via* le gradient électrochimique qu'ils sont capables de générer. Les différents types de transporteurs, décrits ci-après, sont représentés sur la Figure 6 (page 23), sous forme de macarons numérotés.

## **II.2 - Maintien de l'homéostasie cellulaire**

La vacuole végétale peut, dans certaines conditions, représenter jusqu'à 90 % du volume cellulaire total. Le volume cytosolique ne correspondant plus qu'à moins du dixième de celui de la vacuole, il forme des travées cytoplasmiques qui sont des invaginations de tonoplaste comblées de cytosol. Un tel rapport de volume suggère qu'un faible **flux moléculaire entre ces deux compartiments** permettra un ajustement précis de la concentration cytosolique sans influencer de façon prononcée l'osmolarité de la vacuole. Cette particularité fait, de la vacuole, un organe adapté au maintien d'une certaine « inertie » ionique et métabolique dans le cytosol. De plus, le cytosol étant un lieu de synthèse actif et une interface d'échange entre tous les organelles, son pH physiologique (pH 7) et ses concentrations doivent être constants. La vacuole est à ce titre un lieu privilégié de stockage d'ions inorganiques ( $H^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Na^+$ ,  $Cl^-$ ,  $K^+$ ,  $NO_3^-$ ,  $Pi$  ...) et de molécules plus complexes (carbohydrates, acides aminés, protéines ...). La vacuole assure le stockage ou l'export de ces éléments **en fonction de leur concentration cytosolique et des besoins de la cellule.**

La figure ci-dessous (Figure 6) résume les différents types de transporteurs vacuolaires connus à ce jour qui seront décrits dans les paragraphes suivants de cette introduction.



**Figure 6 :** Transporteurs vacuolaires décrits au niveau moléculaire (A) et définis à partir de faits expérimentaux (B) (données d'électrophysiologie, transports et études de compartimentation). D'après Martinoia *et al.* (2007).

(A) En rouge sont symbolisés les transporteurs primaires, en bleu les transporteurs d'eau et de solutés organiques, en orange les canaux et transporteurs d'anions inorganiques, en vert les transporteurs de cations et en rose le transport secondaire des métabolites.

1) V-PPase – 2) V-ATPase – 3) MRP – 4) pompe  $\text{Ca}^{2+}$  type P – 5 à 7) TIPs – 8) tDT et ALMT9 – 9) exporteur de sulfate – 10) antipores à nitrate – 11) NRAMPs – 12) MTPs  $\text{Zn}^{2+}$   $\text{Mn}^{2+}$  – 13) CAX  $\text{Ca}^{2+}$  principalement mais  $\text{Cd}^{2+}$  aussi – 14) transporteur de Mg – 15) symport  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  – 16) TPK1 (KCO1) un canal VK – 17) TPC1 un canal SV – 18) transporteur MATE.

(B) En bleu sont représentés les transporteurs de sucres (glucose, fructose, sucrose et inositol de 1 à 5), ceux de malate/fumarate et citrate (6, 7) et les transporteurs d'acides aminées (8). En orange sont symbolisés les transporteurs de type canaux anioniques (9 et 10), en 11 import de sulfate, en 12 de phosphate et en 13 export de phosphate. Enfin en vert de 14 à 19 les canaux cationiques ( $\text{Ca}^{2+}$  -  $\text{K}^{+}$  -  $\text{Fe}^{2+}$ ) et 20 transporteurs du métabolisme secondaire.

## II.2.1 - Homéostasie des micro-éléments essentiels

### II.2.1.1 - Régulations des pH cytosolique et vacuolaire

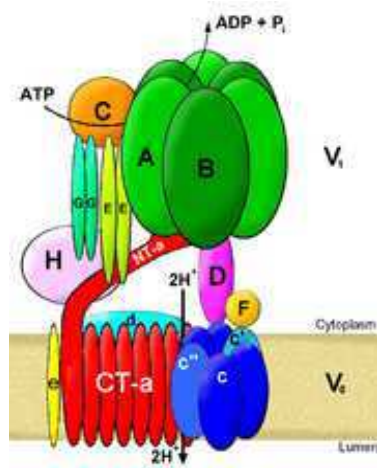
La régulation du pH repose sur les **protons ( $\text{H}^{+}$ )**, ces ions sont transportés de façon active dans la vacuole et sont à l'origine de la mise en place d'un gradient de pH de part et d'autre du tonoplaste. Ce gradient de  $\text{H}^{+}$  contribue non seulement à réguler le pH cytosolique, mais également à maintenir un pH vacuolaire ( $\text{pH}_v$ ) acide, compris entre 5,5 et 6,5 (Muller *et al.*, 1996). La présence d'acides organiques tels que du malate ou du citrate, en quelques occasions, peut influencer de manière prononcée le  $\text{pH}_v$ .

**L'équilibre** entre l'entrée et la sortie des  $\text{H}^{+}$  est assuré par plusieurs protéines. **L'efflux** est assuré par des **antiports** échangeant des ions  $\text{Na}^{+}/\text{H}^{+}$  et  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$  (Figure 6A, macarons n°13 et 15). Les deux transporteurs, chargés de l'**influx** des protons, sont les deux protéines vacuolaires les mieux caractérisées : d'une part l'ATPase vacuolaire (**V-ATPase**), qui hydrolyse l'ATP comme source d'énergie, et la pyrophosphatase vacuolaire (**V-PPase**) qui consomme du pyrophosphate (PPi) (Figure 6A, n°1 et 2). Les contributions relatives de ces deux transporteurs dans l'établissement du gradient ne sont pas connues, mais la densité de la V-PPase à la surface du tonoplaste est décrite comme étant supérieure à celle de la V-ATPase (Maeshima, 2001). Ces deux pompes sont, avec les TIP (*Tonoplast Intrinsic Protein* - aquaporines) les principales protéines constituant le pool protéique de la membrane vacuolaire.

**L'ATPase vacuolaire est un complexe**, de 400 à 750 kDa, composé de 2 domaines : le domaine catalytique  $V_1$ , soluble et responsable de l'hydrolyse de l'ATP, et le domaine  $V_0$  membranaire, qui permet la translocation des protons (Figure 7). Chacun de ces domaines est un complexe macromoléculaire de 8 protéines pour  $V_1$  et de 5 protéines pour  $V_0$ . Chacune de ces protéines est représentée par 1 à 5 isoformes (Sze *et al.*, 2002). Son fonctionnement est comparable à celui de l'ATPase de type F, localisée notamment à la membrane interne des mitochondries et des chloroplastes, mais selon un principe inverse, l'ATP étant consommé pour générer le gradient. Dans le cas de la V-ATPase, l'énergie chimique résultant de l'hydrolyse de l'ATP est convertie en énergie mécanique, matérialisée par la rotation de la sous-unité  $V_1$  par rapport à la sous-unité  $V_0$  (Imamura *et al.*, 2003). Ce changement de conformation force le



**passage** au travers de la membrane, contre leur gradient de concentration, de **2 à 3 H<sup>+</sup>** par molécule d'**ATP hydrolysée** (Kawasaki-Nishi *et al.*, 2003) (Figure 6A, n°2).



D'après Sze *et al.*, 2002

Sous-unité et fonction		Nom	Taille (kDa)
<b>Domaine catalytique V<sub>1</sub></b>			
A	Sous unité catalytique de liaison à l'ATP	VHA-A	68
B	Sous unité non-catalytique de liaison à l'ATP	VHA-B	54
C	Stabilité du domaine V <sub>1</sub>	VHA-C	42
D	Axe central, couplage	VHA-D	29
E	Axe central ou périphérique	VHA-E	26
F	Liaison entre les domaines V <sub>1</sub> et V <sub>0</sub>	VHA-F	14
G	Couplage entre les domaines V <sub>1</sub> et V <sub>0</sub>	VHA-G	12
H	Sous unité régulatrice	VHA-H	50
<b>Canal à protons V<sub>0</sub></b>			
a	Couplage, assemblage	VHA-a	89 - 95
c	Translocation des protons	VHA-c	16
c''	Translocation des protons	VHA-c''	18
d	Assemblage et stabilité du domaine V <sub>0</sub>	VHA-d	40
e	Stabilité du domaine V <sub>0</sub> ??	VHA-e	~8

**Figure 7 : Structure de l'ATPase vacuolaire de plante.** Le domaine soluble V<sub>1</sub> hydrolyse l'ATP, présent dans le cytosol, ce qui permet le passage de protons, à travers le domaine V<sub>0</sub> membranaire, vers l'intérieur de la vacuole. La fonction, des sous-unités protéiques qui composent chacun des domaines, est indiquée, ainsi que leur nomenclature et leur taille. Source : Sze *et al.*, 2002

Le second transporteur de protons participant à l'établissement du gradient est la **pyrophosphatase** (V-PPase) (Figure 6A, n°1). Cette protéine à activité enzymatique, de 80 kDa, peut représenter de 1 à 10 % du protéome tonoplastique (Rea *et al.*, 1992). Son activité strictement magnésium-dépendante a été mise en évidence (Walker & Leigh, 1981) sans que son substrat exact MgPPi ou Mg<sub>2</sub>PPi, n'ait été identifié. Malgré son clonage en 1992 (Sarafian *et al.*, 1992), la V-PPase n'est pas pleinement caractérisée aujourd'hui. Cette pompe est inhibée de façon réversible par le calcium (Ca<sup>2+</sup>), probablement *via* la formation d'un inhibiteur compétitif potentiel le CaPPi. Le produit de la réaction enzymatique (le potassium) agit comme un activateur de l'activité pyrophosphatase (Walker & Leigh, 1981 ; Davies *et al.*, 1991). Certains travaux suggèrent que le potassium pourrait lui-même être transporté en synergie avec les protons par la V-PPase (Davies *et al.*, 1992).

La V-ATPase et la V-PPase réalisent le **transport actif<sup>9</sup> primaire** des protons. Pour désigner les mesures thermodynamiques de ces réactions électrochimiques, on parle de Force Proton Motrice (*Proton motive force* - PMF) et de  $\Delta pH$  engendrés par le gradient de protons ( $H^+$ ). La force proton-motrice générée par la V-PPase est de l'ordre de 300mV et de 200 mV pour la V-ATPase avec une  $Em^{10}$  estimée à 20-30 mV. La PMF générée permet d'activer des transporteurs secondaires, symports ou uniports selon qu'ils transportent des solutés dans le même sens ou dans le sens opposé. Ces **transports actifs secondaires** impliquent l'utilisation du gradient électrochimique de protons et se traduisent par un cotransport d'un  $H^+$  et d'un soluté. Plusieurs de ces protéines, responsables de l'efflux de  $H^+$  à travers le tonoplaste, ont été mises en évidence dans la vacuole, par exemple :

- des **symports** :  $NO_3^- / H^+$  (Blumwald & Poole, 1985a),  $SO_4^{2-} / H^+$  (Hüve *et al.*, 1995), glucose /  $H^+$  (Neuhaus, 2007), lactose /  $H^+$  (De, 2001) ou encore saccharose (Schneider *et al.*, 2011) (Figure 6A n°5 et 11)
- et des **antiports** :  $Na^+ / H^+$  (Apse & Blumwald, 2007),  $Ca^{2+} / H^+$  (Sze *et al.*, 2000),  $NO_3^- / H^+$  (De Angeli *et al.*, 2006) ou saccharose /  $H^+$  (Briskin *et al.*, 1985) (Figure 6A, n°10, n°12 à 15 et B n°5).

Le gradient de pH mis en place, neutre du côté cytosolique et acide du côté vacuolaire, est essentiel au fonctionnement de ces compartiments. D'une part, le pH neutre cytosolique est primordial à l'homéostasie cellulaire, d'autre part le pH vacuolaire acide instaure un environnement favorable à un grand nombre d'enzymes vacuolaires. Leurs activités seraient fortement réduites, voire inhibées, dans un milieu plus alcalin (Mayne & Kende, 1986 ; Canut *et al.*, 1987).

### II.2.1.2 - Stockage d'ions inorganiques

K.W. Von Nägeli en 1844, un des premiers biologistes à s'intéresser à la vacuole, comparait le milieu vacuolaire à de l'eau de mer. Des études à la fin des années 60 (Mac Robbie 1971, Saddler 1970 et Gutknecht 1968) ont montré que les concentrations ioniques mesurées pour des sucs vacuolaires d'algues étaient supérieures à celles de l'eau de mer. Des ions inorganiques tels que le potassium ( $K^+$ ) (Figure 6B, n°17 et 18), le sodium ( $Na^+$ ), le calcium ( $Ca^{2+}$ ), le magnésium ( $Mg^{2+}$ ), le chlore ( $Cl^-$ ), le sulfate ( $SO_4^{2-}$ ), le nitrate ( $NO_3^-$ ) et le phosphate

<sup>9</sup> Le **transport actif** désigne le passage d'un ion ou d'une molécule à travers une membrane contre son gradient de concentration. Si le processus utilise de l'énergie chimique produite par exemple, par l'hydrolyse d'un nucléotide triphosphate comme l'adénosine triphosphate, on le nomme transport actif primaire. Le Transport actif secondaire implique l'utilisation d'un gradient électrochimique. On oppose le transport actif au transport passif qui lui n'utilise pas d'énergie.

<sup>10</sup>  **$Em$  = Energie mécanique** est une quantité utilisée en mécanique classique pour désigner l'énergie d'un système emmagasinée sous forme d'énergie cinétique et d'énergie potentielle mécanique.

( $\text{PO}_4^-$ ) sont massivement stockés dans les vacuoles des algues, de 10 à 50 fois plus concentrés que dans l'eau de mer (De, 2000).

a) *Exemple de cations*

Dans les années 70 et 80, de nombreuses études de différentes plantes ont révélé une variabilité de composition ionique (Figure 6B, n°9 et 10), organes et espèce dépendantes. En 1987, Kinzel, sur cette base d'observations met en évidence une forte accumulation de calcium dans les vacuoles commune à de nombreuses familles de plantes (De, 2000). Le calcium peut représenter jusqu'à 5 % de la masse sèche d'une plante (Broadley *et al.*, 2003).

Le **calcium** est un composant essentiel du réseau de signalisation cellulaire. Sa concentration libre cytosolique, inférieure au micromolaire (100 à 350 nM ; Felle, 1989), est maintenue à un très faible niveau en absence de signal. Sa concentration vacuolaire est d'un ordre de grandeur supérieur : le millimolaire (1,5 à 2,3 mM ; Felle, 1988). L'accumulation du  $\text{Ca}^{2+}$  dans la vacuole nécessite un transport actif, rendu possible par 2 types de transporteurs : des **ATPase de type P** (Sze *et al.*, 2000) (Figure 6A, n°4), et des antiports  $\text{Ca}^{2+} / \text{H}^+$  (Figure 6A, n°13) de la famille **CaX** (*Cation eXchanger*, Shigaki & Hirschi, 2006). Les ATPases présentent une plus haute affinité pour le calcium ( $K_m = 0,2$  à  $1 \mu\text{M}$ ) que les CaX ( $K_m \sim 10 \mu\text{M}$ ) mais leur *turnover* est décrit pour être plus lent. Ces deux transporteurs assurent probablement des rôles différents dans le maintien et le rétablissement des concentrations calciques cytosoliques.

A l'inverse, la libération du calcium ne nécessite pas d'énergie, et circule par au moins 4 transporteurs : deux canaux voltage-dépendants (VVCa et SV) et deux canaux de type « *ligand-gated* » (Sanders *et al.*, 2002) (Figure 6A, n°16 à 17). Les **canaux de type VVCa** (*Vacuolar Voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$* ) s'ouvrent pour des potentiels de membrane positifs côté cytosol, compris entre + 25 et + 40 mV (Johannes *et al.*, 1992). Or, ces valeurs sont en dessous des potentiels de membrane mesurés entre le tonoplaste et le cytosol, autour de + 50 mV côté cytosol (Sze, 1985). La régulation de l'ouverture de ce transporteur est inhibée par les protons vacuolaires et activée par le calcium. La libération de  $\text{Ca}^{2+}$  faisant basculer le canal vers une conformation ouverte et compte tenu de la différence de concentration en ions  $\text{Ca}^{2+}$  entre les deux compartiments, ce canal pourrait être impliqué dans l'amplification d'un signal calcique existant et non dans le maintien de l'homéostasie calcique cytosolique.

Les **canaux de type SV** à réponse lente (*Slow-activating Vacuolar*) sont parmi les canaux ioniques les plus connus de la vacuole, en particulier grâce à l'identification d'un membre de cette famille : **TPC1** (*Two Pore Chanel 1*, Furuichi *et al.*, 2001) (Figure 6A, n°17). Ce transporteur est activé par le calcium et le magnésium (Pei *et al.*, 1999). Il présente deux sites de liaison aux métaux : l'un, catalytique, spécifique du calcium et l'autre, activateur, acceptant le calcium ou le magnésium avec des affinités comparables de l'ordre du millimolaire

(Pei *et al.*, 1999). L'inhibition de TCP1 est causée par certains métaux lourds tels que  $\text{Zn}^{2+}$  et  $\text{Ni}^{2+}$  (Carpaneto, 2003). Ce transporteur est décrit pour être le canal le plus abondant du tonoplaste, avec une densité de l'ordre de 1 protéine /  $\mu\text{m}^2$ . Chez les mutants *tpc1* (Peiter *et al.*, 2005), la perte d'efflux calcique vacuolaire à réponse lente indique que les SV seraient les seuls canaux tonoplastiques impliqués dans le maintien de l'homéostasie calcique cytosolique. Cette donnée confirmerait le rôle des canaux de type VVCa dans l'amplification d'un signal calcique existant.

L'ouverture et la fermeture des stomates dépendent de l'homéostasie ionique vacuolaire des cellules de garde et font intervenir le  $\text{Ca}^{2+}$  comme messenger secondaire. Des études montrent une implication de l'inositol 1,4,5-triphosphate ( $\text{IP}_3$ , DeWald *et al.*, 2001) et du cADP Ribose (cADPR, Grabov & Blatt, 1999) dans la libération de calcium vers le cytosol (Figure 6B, n°14 et 15). De façon surprenante, la caractérisation moléculaire de leurs transporteurs n'a pas encore été réalisée, et leurs localisations tonoplastiques ne sont pas totalement avérées. Les expériences de patch-clamp réalisées sur vacuoles isolées n'ont pas permis de confirmer leurs présences (Pottosin & Schonknecht, 2007). Le calcium libéré pourrait avoir pour origine le réticulum endoplasmique (Martinec *et al.*, 2000 ; Navazio *et al.*, 2001).

En ce qui concerne **le sodium**, Flowers (1975) proposait que chez les espèces tolérantes au stress salin, l'excédant cytosolique d'ions pouvait être accumulé dans la vacuole. Quelques années plus tard, il analyse par microscopie-rayon X les concentrations intracellulaires de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  et  $\text{K}^+$  sur des coupes de *Suaeda maritima* une chénopodiacée halophyte<sup>11</sup> (Hajibagheri & Flowers, 1989). Il démontre que les concentrations cytosoliques pour les ions  $\text{Na}^+$  et  $\text{Cl}^-$  étaient respectivement de 118 et 90 mM, et que les concentrations vacuolaires atteignaient 423 et 445 mM. Il prouve alors la capacité de la cellule à concentrer dans la vacuole les ions excédentaires. Des travaux similaires mesurant les concentrations des ions  $\text{Na}^+$  et  $\text{Cl}^-$  sur des tabacs adaptés au stress salin, ont abouti à l'observation de concentrations vacuolaires élevées de 780 et 624 mM contre des concentrations cytosoliques plus faibles de 96 mM (Binzel *et al.*, 1988). Il existe donc un transporteur de  $\text{Na}^+$  impliqué dans la détoxication cytosolique du  $\text{Na}^+$ . L'observation de la disparition d'un gradient de protons préétabli dans des vésicules de tonoplaste lors de leur incubation dans une solution de  $\text{Na}^+$  (Blumwald & Poole, 1985b ; Garbarino & Dupont, 1989) a suggéré pour la première fois l'existence d'un antiport  $\text{Na}^+ / \text{H}^+$  (Figure 6A, n°15).

---

<sup>11</sup> Une **plante halophyte** est une plante adaptée aux milieux à forte salinité (milieux à pression osmotique importante). L'une des halophytes les plus connues est la salicorne, espèce endémique des marais salants. En zone tropicale, le palétuvier est également une plante halophyte.

b) *Exemple d'anions*

**Le soufre** est un élément constitutif de deux acides aminés essentiels : la cystéine et la méthionine, donc indispensable à la vie cellulaire. Le soufre est principalement assimilé sous forme de sulfate ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) au niveau des racines puis conduit vers les organes de synthèse. Lorsqu'il est en excès dans le cytosol, des **ATPases tonoplastiques** transportent ce soufre vers la vacuole (Kaiser *et al.*, 1989) jusqu'à augmenter la concentration vacuolaire en soufre d'un facteur 10 dans les cellules de mésophile d'orge cultivées sur un milieu riche en soufre (Figure 6B, n°11). Un phénomène de régulation a été observé chez la lentille d'eau (*Lemna minor*) et la carotte (*Daucus carota*). L'augmentation de la concentration en soufre dans la vacuole conduit à un rétrocontrôle de l'assimilation du soufre à travers la membrane plasmique (Cram, 1983). L'augmentation de l'activité de pompes d'efflux plasmalemmique s'opère jusqu'à atteindre un équilibre entre influx et efflux du sulfate ce qui stabilise alors la concentration cytosolique (Rennenberg, 1984). Le sulfate vacuolaire peut ensuite être libéré vers le cytosol en fonction des besoins de la cellule. Chez *Arabidopsis*, deux transporteurs, de type **SULTR4** (Figure 6A, n°9), SULTR4.1 et SULTR4.2, ont été localisés à la vacuole grâce à des expériences de fusion traductionnelle avec la GFP (Kataoka *et al.*, 2004). Ils sont responsables de l'efflux de sulfate, et sont clairement mis en évidence pour leur rôle essentiel dans l'homéostasie du soufre.

Une autre source importante de soufre dans la cellule est due à l'absorption par les feuilles de dioxyde de soufre ( $\text{SO}_2$ ) gazeux, généralement présent à hauteur de 1 à 5  $\mu\text{g} / \text{m}^3$  dans l'atmosphère (pouvant aller jusqu'à 140  $\mu\text{g} / \text{m}^3$  ; Kaiser *et al.*, 1989). L'hydratation du  $\text{SO}_2$  dans le cytosol conduit à la formation de  $\text{HSO}_3^-$ ,  $\text{SO}_3^{2-}$  et  $\text{H}^+$  (Figure 6B, n°11). La vacuole va permettre de stocker le sulfate excédentaire qui sera ensuite utilisé dans le chloroplaste, comme précurseur de la synthèse de cystéine et de méthionine. Ces acides aminés soufrés constitueraient deux formes de stockage du soufre (De, 2001).

La concentration intra-vacuolaire en **chlore** ( $\text{Cl}^-$ ) est impliquée dans la régulation de l'activité de transporteurs d'anions, en particulier le transport de phosphates et de nitrates (Plant *et al.*, 1994). La vacuole est d'ailleurs décrite pour être un site majeur de stockage du nitrate (Granstedt & Huffaker, 1982).

Le **nitrate** ( $\text{NO}_3^-$ ) : Les travaux de Plant *et al.* (1994) ont mis en évidence l'existence d'un transporteur, de type uniport, permettant l'influx de nitrate dans la vacuole ; l'efflux de  $\text{NO}_3^-$  étant régulé par un symport  $\text{NO}_3^- / \text{H}^+$  (Blumwald & Poole, 1985b) (Figure 6A, n°10).

Le **phosphate** ( $\text{PO}_4^-$ ) semble majoritairement vacuolaire chez les plantes, jusqu'à 95 % du pool cellulaire. Des travaux conduits sur la levure révèlent des proportions du pool vacuolaire variables entre 15 % (Kulaev *et al.*, 1999) et 100 % (Urech *et al.*, 1978). Pourtant, aucun transporteur tonoplastique n'a clairement été identifié à ce jour, même si on peut suspecter un transporteur d'efflux POH1 (Stefanovic *et al.*, 2011). Lors d'une carence en

phosphate, le stockage vacuolaire du phosphate semble primordial pour la croissance cellulaire (Westenberg *et al.*, 1989, Rouached *et al.*, 2011). Ces observations suggèrent que la **vacuole est le site privilégié**, sinon exclusif, du maintien de l'homéostasie cellulaire du **phosphate** (Figure 6B, n°12 et 13).

c) *Conclusion sur le stockage des ions inorganiques et fonctions*

Le stockage de divers ions dans la vacuole peut avoir plusieurs implications. Il peut s'agir de la **régulation de la concentration ionique cytosolique** pour y ajuster la disponibilité des ions. Le but est alors soit de permettre le bon fonctionnement des activités métaboliques, soit de contrebalancer un influx particulièrement important dans le cytosol. D'autre part, il peut s'agir de la **régulation de la signalisation** induite par certains de ces ions comme le  $\text{Ca}^{2+}$ , ou encore de la régulation de la **turgescence** de la vacuole. Les vacuoles ont une pression osmotique légèrement supérieure à celle de l'eau de mer. Cette hypertonie entraîne une surpression des sucs vacuolaires sur le tonoplaste qui distend les parois cellulaires, c'est la turgescence. Les mécanismes de turgescence-plasmolyse sont particulièrement importants pour leur effet mécanique sur la plasticité et le port dressé des plantes. Mais ils le sont aussi dans les mécanismes d'ouverture-fermeture des cellules de garde des stomates (Ward *et al.*, 1995). Lorsque la cellule végétale est plasmolysée, elle va recréer un milieu favorable afin de retrouver sa turgescence (Schroeder *et al.*, 2001). Cette propriété des cellules végétales à pratiquer une absorption supplémentaire de sels minéraux pour maintenir leur pression osmotique interne, légèrement supérieure à celle du milieu, est nommée **épictèse**<sup>12</sup>. Ce mécanisme, en contradiction avec les lois de l'osmose, nécessite une certaine dépense d'énergie. Pour d'autres cellules, la modulation de la turgescence cellulaire se fait *via* l'homéostasie hydrique de la vacuole et permet d'exercer un effort mécanique. C'est le cas par exemple pour les lobes des pièges à insectes du genre *Dionaea* et les feuilles de mimosa sensibles aux contacts, les *sensitives*. Ces mécanismes, qui nécessitent des mouvements rapides, sont donc régulés par des échanges de molécules d'eau (Javot & Maurel, 2002).

### II.2.1.3 - Stockage de l'eau

La vacuole est le lieu principal de stockage de l'eau dans la cellule végétale. Le transport de l'eau est assuré par les **aquaporines** désignées comme des TIP (*Tonoplast Intrinsic Protein*) (Figure 6A, n° 7). Cette découverte d'un **transport passif** des molécules d'eau à travers les membranes considérées comme imperméables à l'eau fut surprenante. Les

<sup>12</sup> L'épictèse est un terme issu du grec « ktésis », acquisition, et du préfixe « épi », en supplément. Cette propriété des cellules végétales d'absorber un surplus de sels minéraux fut découverte par le physiologiste français Lapique en 1925 sur l'algue brune *Ectocarpus*.

aquaporines ne sont pas l'apanage des plantes et sont également présentes chez les animaux, néanmoins dans le génome d'*Arabidopsis thaliana*, 35 aquaporines sont prédites (Wudick *et al.*, 2009). L'expression et l'activité des aquaporines semblent être régulées par la phosphorylation d'un site spécifique (Tyerman *et al.*, 2002 ; Maurel *et al.*, 2008). Les aquaporines peuvent aussi être régulées par le pH, la concentration en calcium, l'hétéromérisation et les espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Maurel, Verdoucq, D.-T. Luu, & Santoni, 2008).

Cette capacité de **régulation hydrique rapide** est spécifique aux plantes. Elle est impliquée dans des mécanismes de réponse au rythme circadien, au stress notamment salin, à la sécheresse, mais aussi à l'anoxie. Une hypothèse actuellement débattue suggère que les aquaporines pourraient permettre l'absorption de CO<sub>2</sub> dans les cellules. Mais aussi qu'elles pourraient être des **senseurs** de la pression de turgescence et du gradient osmotique de part et d'autre de la membrane vacuolaire (Hill *et al.*, 2004).

#### II.2.1.4 - Stockage de molécules plus complexes

##### a) *Les acides aminés*

La présence d'acides aminés libres dans la vacuole (Martinoia *et al.*, 1981) résulte de la **dégradation de certaines protéines** par des protéases et d'un influx depuis le cytosol. D'élégants travaux chez *Saccharomyces cerevisiae* par Kitamoto *et al.* (1988) ont montré l'importance des vacuoles dans l'homéostasie des acides aminés. Chez la levure, en complétant le milieu de culture, avec des acides aminés basiques, tels que la lysine, l'histidine et l'arginine, le pool d'acides aminés vacuolaires augmente tandis que le pool d'acides aminés cytosoliques reste constant. Les auteurs ont également démontré que lorsque l'arginine est en excès dans le cytosol et en cas de carence en azote, le pool d'arginine est dégradé par l'arginase pour être consommé comme source d'azote. D'une manière générale chez les plantes, et bien que le **ratio entre acides aminés cytosoliques et vacuolaires dépende fortement de l'acide aminé** et de l'espèce végétale considérés, leur concentration vacuolaire (C<sub>v</sub>) reste relativement faible comparée à leur concentration cytosolique (C<sub>c</sub>). Certains travaux mentionnent par exemple une concentration totale vacuolaire inférieure à 2 mM contre 275 mM dans le cytosol (Winter *et al.*, 1993). D'autres travaux de ce même groupe concluent à un rapport C<sub>c</sub>/C<sub>v</sub> de 41, 38 et 26 pour respectivement la glutamine, le glutamate et l'aspartate, dans les feuilles d'épinard (Winter *et al.*, 1994), confirmant la faible teneur en acides aminés de la vacuole. Les acides aminés semblent être les principaux solutés des compartiments cytosolique et stromal (180 mM et 220 mM respectivement, (Riens *et al.*, 1991)). Bien que la C<sub>v</sub> en acides aminés (12 mM) soit évaluée inférieure d'un ordre de grandeur à la C<sub>c</sub> en raison du grand volume vacuolaire, le **pool d'acides aminés vacuolaires** représente relativement **20 à 25%** du pool total cellulaire. Malgré

la faible concentration en acides aminés présents dans la fraction vacuolaire, ils constituent néanmoins une réserve importante pour la cellule.

La mise en évidence de transporteurs tonoplastiques impliqués dans la translocation des acides aminés, dans un sens ou dans l'autre, atteste du rôle actif majeur de la vacuole dans l'homéostasie de ces éléments, notamment de leur influx depuis le cytosol (Figure 6A, n°3 et B n°8). Plusieurs études, conduites sur des vacuoles de mésophylle d'orge, ont abouti à la mise en évidence de transporteurs de phénylalanine (Homeyer & Schultz, 1988), d'alanine, de glutamine, de leucine et de méthionine (Dietz *et al.*, 1990), d'arginine et d'aspartate (Martinoia *et al.*, 1991), ou encore de glycine (Goerlach & Willms-Hoff, 1992).

#### b) Les sucres

Le **saccharose** est le premier glucide synthétisé dans les feuilles par la photosynthèse. Ensuite véhiculé à travers la plante, via le phloème, il constitue la forme principale d'énergie et de carbone dans la plante. Le saccharose est la source de glucose, de fructose et d'autres sucres, ainsi que l'amidon présent dans les plantes. La plus grande concentration de saccharose pure se trouve dans les **vacuoles de la canne à sucre et de la betterave sucrière** (*Beta vulgaris* :  $C_c = 76$  mM,  $C_v = 514$  mM ; Saftner *et al.*, 1983). Si dans certains cas la concentration de saccharose vacuolaire est de loin supérieure à celle du cytosol, elle lui est souvent inférieure (orge :  $C_c = 232$  mM,  $C_v = 21$  mM ; Winter *et al.*, 1993, épinard :  $C_c = 53$  mM,  $C_v = 11$  mM ; Winter *et al.*, 1994). Si le saccharose ne s'accumule pas dans la vacuole, d'autres hexoses peuvent s'y concentrer (Preisser *et al.*, 1992 ; Heineke *et al.*, 1994).

Le transport du saccharose à travers le tonoplaste a lieu grâce à des voies de **transport passif** par simple diffusion (De Leon *et al.*, 1988), ou actif par un **antiport saccharose /  $H^+$**  (Figure 6B, n° 5) (Wilson & Lucas, 1987 ; Thom & Komor, 1984). La famille de symport saccharose /  $H^+$  (SUC), identifiée chez *Arabidopsis* (Weise *et al.*, 2000), est caractérisée au point de vue moléculaire et fonctionnel au niveau du tonoplaste (AtSUC4 - Schneider *et al.*, 2011). En 1988, les travaux de Voß et Weidner sur la betterave rouge mettent en évidence cinq activités enzymatiques ATP-dépendant permettant la synthèse et le transfert du saccharose depuis le cytosol vers la vacuole (Voß & Weidner, 1988). Jusqu'à présent, aucun mécanisme similaire n'a pu être observé chez d'autres espèces végétales. L'hypothèse de transporteurs indépendants des mécanismes de synthèse reste la plus probable (De, 2001). Chez *Arabidopsis thaliana*, une famille de transporteurs tonoplastiques de monosaccharides, appelée *Tonoplast Monosaccharide Transporter* (**TMT**, Wormit *et al.*, 2006) a été identifiée (Figure 6B, n°1 à 5). Ils catalysent l'import de glucose et de fructose dans la vacuole *via* la force proton-motrice.



### c) Les acides organiques

Les acides organiques (AO) sont des métabolites formés d'un groupe acide (COOH) auquel se rattache une chaîne présentant un nombre variable d'atomes de carbone. Chez les plantes, il s'agit d'**acides dicarboxyliques**, tels que l'oxalate, le malate, ou le tartrate (Wagner, 1981), soit d'**acide tricarboxylique** comme le citrate (Muller *et al.*, 1996). Les AO sont décrits comme étant en quantité suffisante pour atteindre parfois 50 % de la masse sèche de certaines feuilles. Leur concentration vacuolaire peut être jusqu'à 24 fois supérieure à celle du cytosol (dans le cas de l'acide citrique ; De, 2001) (Figure 6B, n°6 et 7).

Ces acides organiques sont évidemment stockés dans la vacuole, et y ont diverses fonctions. Comme mentionné précédemment, la régulation du pH est principalement contrôlée par les protons  $H^+$ , mais les AO peuvent également en être à l'origine. Par exemple, le **citrate** stocké dans les vacuoles des fruits du citronnier entraîne une baisse allant jusqu'à atteindre la valeur de 2,5 unité pH. Autres fonctions, dans le contrôle de la turgescence par exemple, le **malate** participe aux mécanismes d'épictèse. Chez les plantes à métabolisme crassulacéen (*Crassulcean acid metabolism*, CAM), la photosynthèse est caractérisée par la production d'acide malique. Le  $CO_2$  est fixé pendant la nuit par la phosphoénol-pyruvate carboxylase, et stocké dans la vacuole sous forme d'acide malique, après l'action de la malate deshydrogénase. De jour, les stomates se ferment pour limiter les pertes en eau et le malate vacuolaire est libéré dans le cytosol. Sous l'action de l'enzyme malique chloroplastique NADP-dépendante, il est transformé en  $CO_2$  + pyruvate. Le  $CO_2$  est alors fixé par la RuBisCO pour sa réduction en glyceraldehyde-3-phosphate.

Deux transporteurs vacuolaires d'acides organiques ont été identifiés. Ils participent à l'influx de malate dans la vacuole (Figure 6A, n°8). Le premier, **AtDT**, a été identifié sur la base de son homologie avec un symport  $Na^+$  / acide dicarboxylique rénal humain (Emmerlich *et al.*, 2003). Le second transporteur identifié est **AtALMT9** (Kovermann *et al.*, 2007) (Figure 6A, n°8).

## II.3 - Biosynthèse vacuolaire

### II.3.1 - Anabolisme des glycosides

De nombreux métabolites secondaires s'accumulent dans la vacuole, notamment des composés phénoliques qui y sont conjugués par l'ajout de groupements carbohydrates. La **formation de glycosides** augmente la solubilité et la mobilité des métabolites, suggérant une

facilitation des processus de transport et de stockage dans la vacuole (Browne & Coombe, 1984).

L'activité anabolique, reliée au tonoplaste, peut être illustrée par la synthèse du saccharose à partir du glucose-phosphate cytosolique. Les invertases vacuolaires assurent un équilibre entre les hexoses (glucose, fructose) et le saccharose. Le **métabolisme des sucres** est d'ailleurs représenté dans la vacuole à travers la synthèse de fructanes comme l'inuline, mais aussi de polymères de fructose formant une réserve cellulaire de carbone (Keller *et al.*, 1988).

La vacuole est le principal compartiment subcellulaire de stockage des conjugués glucosidiques et des hormones végétales en général.

### II.3.2 - Anabolisme de l'éthylène

La dernière étape de la **synthèse de l'éthylène**, à partir de l'acide 1-aminocyclopropane-1-carboxilique, a été observée dans la vacuole (Mayne & Kende, 1986). La localisation de l'étape ultime de la synthèse de cette hormone semble résulter de la nécessité d'un environnement spécifique et optimal pour cette synthèse. Les auteurs montrent que lorsqu'ils altèrent la structure des vacuoles en dénaturant le tonoplaste par des découplants ou une congélation, la synthèse d'éthylène est inhibée. De plus, l'observation d'un accroissement de la synthèse d'éthylène au cours de l'acidification du milieu d'incubation, passant d'un pH de 7,5 à 5, confirme le rôle essentiel de la vacuole.

### II.3.3 - Anabolisme des alcaloïdes

Les alcaloïdes sont principalement synthétisés par 4 familles de plantes, les papavéracées<sup>13</sup>, les renonculacées<sup>14</sup>, les apocynacées<sup>15</sup> et les solanacées<sup>16</sup>. Environ 1000 alcaloïdes provenant de ces plantes supérieures sont connus. La pervenche de Madagascar (*Catharanthus roseus*) a été particulièrement étudiée pour sa capacité à synthétiser plus de cent alcaloïdes différents, dont certains ont une forte valeur pharmacologique<sup>17</sup>. Par exemple, la

---

13 Papavéracées = Papaveraceae plantes lactifères (produisant du latex), par exemple : le pavot, le coquelicot

14 Renonculacées = Ranunculaceae plantes herbacées produisant notamment des cardiotoxines, par exemple : les clématites, le delphinium

15 Apocynacées = Apocynaceae plantes herbacées, par exemple la gentiane, le laurier, la pervenche de Madagascar

16 Solanacées = Solanaceae plantes herbacées, par exemple : la pomme de terre, le tabac, la belladone

17 Valeur pharmacologique : Grâce à la synthèse chimique, les chercheurs ont réussi à obtenir des alcaloïdes plus purs que les alcaloïdes issus des substances végétales. Ceci a permis de diminuer les effets secondaires dans l'organisme au profit de leurs effets pharmacologiques en tant que réels médicaments.

**vinblastine** est un inhibiteur de la polymérisation de la tubuline, utilisée notamment dans le traitement de cancer. Le précurseur de la synthèse des alcaloïdes, le géraniol, est produit dans le chloroplaste, puis transporté à l'intérieur de la vacuole. Le transport du géraniol est assuré par une protéine de type cytochrome P450 liée à la membrane vacuolaire (Meijer *et al.*, 1993). Suite à plusieurs **étapes vacuolaires**, ce précurseur (le géraniol) est transformé en strictosidine, la molécule à l'origine de tous les alcaloïdes indoliques. La suite du processus de synthèse pourrait faire intervenir des étapes cytosoliques et vacuolaires. La strictosidine, transformé en ajmalicine dans le cytosol par élimination d'un groupement glucose, serait ré-importée dans la vacuole (De, 2001).

## **II.4 - Dégradation et recyclage des constituants cellulaires**

La vacuole présente un panel de fonctions indispensables à l'homéostasie cellulaire (cf paragraphes ci-dessus) mais également un potentiel lytique important. Parmi les enzymes vacuolaires, les glycosidases et les peptidases sont majoritaires (Classification et nomenclature des enzymes selon l'IUBMB en annexe 2).

### **II.4.1 - Activités protéasiques**

#### **II.4.1.1 - Spécificité de la vacuole**

Parmi les spécificités de la vacuole, les endopeptidases sont décrites pour être exclusivement vacuolaires (De, 2001). Les **peptidases** vacuolaires présentent une plus grande stabilité que les formes cytosoliques lorsqu'elles sont soumises à des attaques protéolytiques. De plus, elles sont capables de dégrader les protéines du cytosol plus efficacement que les protéases cytosoliques elles-mêmes (Canut *et al.*, 1987). L'**activité** des protéases dans la vacuole est toutefois extrêmement **régulée**, *via* la présence d'**inhibiteurs** (Ryan, 1980) et *via* leur dépendance à un **pH** optimum d'activité (Canut *et al.*, 1987). Le pH intervient de deux manières : soit en modifiant la structure secondaire ou tertiaire de l'enzyme, soit en modifiant les charges électriques des radicaux des acides aminés du site actif.

En 1988, en remplaçant une partie du contenu de vacuoles purifiées par une solution de BSA qui fut entièrement digérée après 16 h d'incubation, Moriyasu et Tazawa, (1988) furent les premiers à mettre en évidence une **activité protéasique à l'intérieur de la vacuole** (Moriyasu et Tazawa 1988). Dans un second temps, le remplacement, non plus partiel, mais total de la fraction soluble par une solution de BSA n'a permis d'observer aucune activité protéasique. Enfin, aucune dégradation protéique n'est observée lors de l'incubation de BSA dans une

suspension de vacuoles lysées (Canut *et al.*, 1985). Ces expériences permettent de conclure à la présence de **peptidases solubles** dans les vacuoles et mettent également en évidence l'importance de **l'intégrité du tonoplaste** pour les activités protéasiques.

#### II.4.1.2 - Rôles dans le cadre du fonctionnement cellulaire

Les activités protéasiques de la vacuole interviennent dans la **dégradation de protéines anormales**. Dans les cellules végétales, les protéines mutées, fonctionnelles ou non, peuvent être spécifiquement dirigées vers la vacuole afin d'y être recyclées (fonctions de protection et recyclage). Un mécanisme d'adressage spécifique de ces protéines vers la vacuole a ainsi été mis en évidence (Pueyo *et al.*, 1995 ; Chang & Fink, 1995). Les protéases vacuolaires peuvent également intervenir dans la **maturation de certaines protéines** (fonctions de régulation positive et de synthèse). Les protéines non fonctionnelles dans le cytosol, pro-actives, deviennent actives après maturation dans la vacuole. C'est, par exemple, le cas de la phosphatase alcaline vacuolaire (Noda *et al.*, 1995) ou des inhibiteurs de protéases (II.5.1.1 - ) Dans le cadre d'un **turnover** plus ou moins rapide des protéines, la vacuole peut être impliquée dans la dégradation de certaines protéines (fonctions de régulation négative) (Canut *et al.*, 1985).

#### II.4.1.3 - Activités protéasiques vacuolaires liées à l'autophagie

L'autophagie vacuolaire est un **processus de dégradation** des molécules endogènes, au cours duquel, des fractions entières non sélectives de cytosol, pouvant éventuellement inclure des organites, sont incorporées dans la vacuole pour y être dégradées. Ce phénomène peut avoir deux origines : une carence en éléments nutritifs conduisant à un **recyclage** d'une partie des éléments cellulaires, ou une évolution de la cellule vers une **différenciation ou indifférenciation** (Reumann *et al.*, 2010).

##### a) *Cas de carence*

Le phénomène d'autophagie, lors d'une carence, a pu être mis en évidence lors d'une **carence carbonée**. Dans le cas de cellules cultivées dans un milieu pauvre en carbone, on observe une forte régression du cytoplasme ainsi qu'une expansion de la vacuole, un des signes de **l'initiation des processus d'autophagie** (Aubert *et al.*, 1996). Toutefois, quelque soit la quantité de sucre (saccharose ou hexoses) disponible, la présence de substrats de la respiration mitochondriale tels que le pyruvate et le glycérol est indispensable pour induire l'activation des processus d'autophagie dans la cellule. L'importance de la réponse de la plante, face aux carences, est étayé par l'hypersensibilité de mutants affectés dans les mécanismes d'autophagie lorsqu'ils sont cultivés en conditions limitantes en nutriments (Bassham *et al.*, 2006).

### *b) Différenciation -Indifférenciation*

Lors de processus de différenciation ou d'indifférenciation, la composition cellulaire est considérablement remaniée. L'autophagie prend des proportions extrêmes puisque **l'ensemble des hydrolases vacuolaires est libéré dans le cytosol**, dans le but de lyser le contenu cellulaire. Ces processus ont été observés lors de la formation de cellules laticifères chez *Euphorbia characias*, lors du développement des cotylédons ou lors de la gamétogenèse (De, 2001 ; Bassham *et al.*, 2006). Le cas le plus flagrant est sans doute la **formation du xylème** primaire et secondaire (Wodzicki & Humphreys, 1973). Dans un premier temps, l'activité photosynthétique est stoppée et la paroi secondaire commence à être produite. La synthèse d'enzymes hydrolytiques, DNase ou protéases augmentent. Elles sont stockées dans la vacuole. Lorsque la consolidation par de la lignine de la paroi est terminée, la vacuole est lysée et l'ensemble des enzymes libéré dans le cytosol. Les faisceaux et vaisseaux de xylème ainsi formés vont permettre un transport efficace de la sève brute.

#### II.4.1.4 - Activités protéasiques vacuolaires liées à l'hétérophagie

Lors de l'activation de la **réponse hypersensible** (*hypersensitive response*, HR), un pathogène induit le déclenchement du programme de mort cellulaire (*programmed cell death*, PCD ou apoptose). Ce mécanisme de défense permet de limiter la zone de contamination. Une protéase vacuolaire particulière,  **$\gamma$ -VPE** (*Vacuolar Processing Enzyme*), y est impliquée. Lors d'une attaque par certains pathogènes, cette protéase à cystéine **comparable aux caspases**, est surexprimée sous forme de préprotéine. Son autolyse en proprotéine dans le cytosol permet son transfert et accumulation dans la vacuole. Une nouvelle maturation permet de l'y activer. La vacuole est alors lysée et les protéases sont libérées dans la cellule et l'apoplasme (Seay & Dinesh-Kumar, 2005).

## **II.5 - Protection cellulaire**

Le troisième grand rôle de la vacuole tient dans sa capacité à **stocker** un grand nombre de **toxiques**. La vacuole héberge des enzymes et métabolites capables de désactiver certains de ces toxiques. Par exemple, les acides organiques participent à la **réduction du potentiel toxique** de certains xénobiotiques par conjugaison. Le stockage permet à la cellule de disposer à la fois d'un arsenal de molécules de **défense contre les prédateurs**, et d'assurer sa protection en confinant ces éléments loin des fonctions métaboliques principales.

## II.5.1 - Défense contre les pathogènes

La réponse de défense des plantes contre les pathogènes peut s'exprimer de nombreuses façons. Il peut s'agir de la formation de calls, la biosynthèse de matériels ligneux ou de phytoalexines<sup>18</sup>, la libération d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, la synthèse d'hydrolases ou d'inhibiteurs de protéases et enfin d'une réaction hypersensible par apoptose. La majorité de ces processus implique directement ou indirectement les vacuoles et apporte encore une nouvelle dimension aux fonctions vacuolaires.

### II.5.1.1 - Les enzymes et leurs inhibiteurs

La première ligne de défense contre les pathogènes est la **protéolyse**. Les attaques d'herbivores entraînent une destruction mécanique des cellules par blessures et confrontent ainsi directement les insectes et les nématodes avec les protéases vacuolaires (De, 2001). L'autre mécanisme de défense essentiel est la présence d'**inhibiteurs de protéases** (*protease inhibitors*, PIs) dirigés contre les protéases des pathogènes et herbivores, qui n'affectent que ces derniers (Molsolov *et al.*, 2001). Parmi les grandes familles d'inhibiteurs, il y a les inhibiteurs de trypsine, famille Kunitz, découverts chez le soja (Ryan, 1989), les inhibiteurs A et B de carboxypeptidase découverts chez la tomate (Mehta *et al.*, 1996) et les inhibiteurs de serine protéase découverts chez l'orge (Mikola *et al.*, 1971). Les PIs peuvent **retarder le développement ou foudroyer** l'insecte qui attaque (Ryan 1990). L'expression des PIs est constitutive ou induite. Afin de protéger les fonctions biologiques endogènes, la majorité des PIs est synthétisée sous forme de précurseurs polypeptidiques inactifs. C'est seulement après avoir atteint les vacuoles, où ils sont convertis en inhibiteurs actifs et matures par une protéolyse ménagée, qu'ils deviennent actifs.

### II.5.1.2 - Les composés phénoliques

Les composés phénoliques sont un groupe hétérogène de molécules dissoutes dans les vacuoles. Parmi celles-ci sont présents, les tanins, les phytoalexines, les pigments (anthoxanthines et anthocyanes). Les **tanins** ont des poids moléculaires compris entre 500 et 3 000 g.mol<sup>-1</sup>. Ils sont célèbres de part leurs proportions et leurs propriétés antioxydantes, notamment dans le raisin et ses produits dérivés. Mais en réalité, ils sont présents dans toutes les parties de la plante (écorces, racines, feuilles, fruits) et y sont avant tout des **armes chimiques défensives** contre les parasites. Mais aussi contre les herbivores, puisqu'en bloquant leurs enzymes digestives, les tannins rendent la plante indigeste.

<sup>18</sup> Les phytoalexines sont des composés antimicrobiens de faible poids moléculaire. Ces petits polyphénols sont synthétisés et accumulés par la plante après avoir été exposée à des microorganismes.

Les **anthoxanthines** sont des pigments vacuolaires de couleurs **jaune et orange** de la famille des flavonoïdes, à ne pas confondre avec les caroténoïdes insolubles et présents sous forme de particule dans le cytoplasme. Les **anthocyanes** sont des pigments vacuolaires de couleurs **rouge, violet et bleu**. Ces pigments, ainsi que les tanins et certains ions métalliques, nuancent les camaïeux des pétales de fleurs. Ils y ont un rôle attracteur pour les insectes, quoiqu'ils semblent également être impliqués dans la protection cellulaire contre les UV (Mori *et al.*, 2005). Non seulement essentielles pour leur stockage, les vacuoles semblent aussi être le lieu de synthèse des anthocyanes, certaines activités ayant été suggérées pour être tonoplastiques (De, 2001). Une fois dans la vacuole, le changement conformationnel induit par le pH piège les anthocyanes, devenus anthocyanosides. Il est alors fréquent qu'ils forment des structures denses globulaires comprenant des protéines (dont VP24), appelées cyanoplastes (Nozue *et al.*, 1997). Les pigments sont des molécules absorbant certaines longueurs d'onde lumineuse. Or en modifiant le pH, la délocalisation électronique de la molécule est modifiée, et donc la couleur. Les **nuances de couleurs** dans le monde végétal sont donc imputables en partie aux variations de **pH vacuolaire**.

Le transport des anthocyanes à travers la membrane vacuolaire peut être le fait de plusieurs mécanismes. Leur acylation dans le cytosol permet, par exemple, leur prise en charge par un transporteur (Hopp & Seitz, 1987). Conjugués à un glutathion, ils sont transportés par une autre voie (Marrs *et al.*, 1995) (Figure 6A, n°3 et 6B, n°20).

### II.5.1.3 - Les alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des substances organiques azotées à caractère alcalin, ayant des propriétés thérapeutiques ou toxiques (caféine, nicotine, théine, morphine, atropine, colchicine, cocaïne ...). Ils sont synthétisés dans les vacuoles et retenus dans les tissus de surface des végétaux, ils y ont un rôle de défense. De part leur propriété antimitotique, ils **régulent la croissance des plantes ou stoppent celles des herbivores** en bloquant la mitose (Vazquez-Flota *et al.*, 2004). Les alcaloïdes sont des molécules potentiellement toxiques pour le métabolisme cellulaire. L'importance de la **séquestration vacuolaire** (Figure 6A, n°18 et B n°20) des alcaloïdes a d'ailleurs été récemment confirmée par l'observation de la formation de nombreuses vacuoles dans des cellules en culture soumises à une exposition de quelques minutes à de la cocaïne (Yu *et al.*, 2008).

## II.5.2 - Détoxification des xénobiotiques

Les xénobiotiques<sup>19</sup> sont des composés issus de la synthèse chimique. Ils ont été baptisés par les activités humaines, drogues, pesticides ou herbicides. Ils sont dispersés dans la nature et les organismes biologiques peuvent y être soumis, causant des effets délétères. Mais chez les plantes, une caractéristique intéressante, la vacuole, leur confère un potentiel à détoxifier, à dégrader complètement ou partiellement ces contaminants organiques de l'environnement. Cette capacité à séquestrer ou à dégrader les xénobiotiques est utilisée en **phytoremédiation**<sup>20</sup> (Kvesitadze *et al.*, 2006). On peut définir trois phases dans le processus conduisant à leur détoxification (Ishikawa, 1992).

**La phase I d'activation ou de transformation** (selon les références) est cytosolique, et fait intervenir des enzymes tels des cytochromes P450 (Barrett, 1995) catalysant l'oxydation, la réduction ou l'hydrolyse du xénobiotique. Lors de cette étape, un groupe fonctionnel hydrophile est ajouté ou rendu accessible afin que l'étape suivante du processus de détoxification, la **conjugaison**, y succède. **La phase II** permet l'adjonction d'un glucose, d'un glutathion ou d'un acide glucuronique le plus souvent, mais aussi d'autres composants cellulaires tels que des acides aminés, des peptides, des protéines, de la lignine ou de l'hémicellulose. Les conjugués obtenus sont en général plus hydrophiles (plus solubles), ont une toxicité réduite (moins mobiles, moins actifs sur leur cible initiale) et sont plus facilement transportables pour leur compartimentation. **La phase III** consiste en la **séquestration** de ces composés conjugués. Dans la plupart des cas, cette dernière étape de la détoxification est un stockage temporaire des conjugués dans des compartiments de la cellule. Les conjugués de composés toxiques solubles sont accumulés dans les vacuoles, alors que les conjugués insolubles sont transportés à l'extérieur de la cellule par exocytose et sont accumulés dans l'apoplasme<sup>21</sup> ou dans la paroi cellulaire. Leur transport à travers le tonoplaste (avant exocytose) est assuré par des protéines de type ABC (Lu *et al.*, 1997), capables de prendre en charge un large spectre de métabolites. Par exemple, le transporteur *AtMRP2* est décrit pour être capable de transporter tout autant les conjugués du glutathion que les produits du catabolisme de la chlorophylle (Lu *et al.*, 1998) (Figure 6A, n°3).

19 Terme issu du grec, xéno « étranger » et de bios « vie », signifiant étranger à l'organisme vivant

20 La phytoremédiation est un terme composé du grec « phyton » plante, et du latin « remedium » rétablissement de l'équilibre. La phytoremédiation est un ensemble de technologies utilisant les plantes pour réduire, dégrader ou immobiliser des composés organiques polluants (naturels ou de synthèse) du sol, de l'eau ou de l'air provenant d'activités humaines.

21 L'apoplasme désigne le continuum extracellulaire formé par les parois pectocellulosiques et les espaces vides entre les cellules végétales.



### II.5.3 - Détoxification des espèces actives de l'oxygène

Les espèces réactives de l'oxygène (*Reactive oxygen species* - **ROS**) sont des espèces chimiques oxygénées très réactives de par la présence d'électrons de valence non appariés à leur surface. Ces molécules nucléophiles, également nommées radicaux libres, sont des ions oxygénés et des peroxydes : peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$ , ion hydroxyle  $OH^\bullet$ , ion superoxyde  $O_2^-$ , radical hydroxyle  $OH^\bullet$  ... Ils apparaissent dans la vie cellulaire suite à des facteurs de stress comme l'exposition aux UV, certains métaux lourds ou certains xénobiotiques mais aussi en tant que **sous-produit du métabolisme** comme lors de la respiration cellulaire ou de la photosynthèse. L'accumulation des ROS dans le cytoplasme entraîne une déstructuration de la cellule par peroxydation des lipides membranaires.

Au sein de la cellule végétale, ces ROS sont aussi bien des composants des voies de signalisation, que des molécules toxiques des mécanismes de défense contre certains pathogènes (Garcia-Brugger *et al.*, 2006). Les ROS sont susceptibles de réagir avec un grand nombre de métabolites cellulaires. La cellule possède des moyens de protection endogène contre les dommages causés par les ROS. Ces antioxydants cellulaires sont répertoriés parmi les enzymes (superoxyde dismutase, catalase, glutathion peroxydase) mais aussi parmi les petites molécules telles que l'acide ascorbique (vitamine C), les tocophérols (vitamines E) et le glutathion qui participent activement à la détoxification. Les **antioxydants vacuolaires, de nature polyphénolique**, interviendraient plus spécifiquement dans la détoxification de l' $H_2O_2$ , suffisamment stable pour diffuser à travers les membranes. Les flavonoïdes, en particulier, sont décrits dans certains travaux, qui suggèrent même une action conjointe d'une peroxydase vacuolaire avec les **flavonoïdes** dans la réduction du peroxyde d'hydrogène (Yamasaki *et al.*, 1997).

### II.5.4 - Compartimentation des métaux lourds

Parmi les métaux, sont distingués ceux dit essentiels ayant une activité biologique ( $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  par exemple), de ceux n'en ayant pas, donc exclusivement toxiques ( $Hg^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  par exemple). La notion de toxicité est intimement corrélée à la quantité et donc au **seuil de la concentration tolérée du métal considéré**. Un excédent d'ions métalliques toxiques libres dans le cytosol peut être confiné dans la vacuole. Cette séquestration vacuolaire s'effectue soit sous forme de sels d'**acides organiques** (Krotz *et al.*, 1989) (Figure 6 A, n° 11 à 14 et n°19), soit liée à des molécules plus spécialisées telles que les **phytates ou les phytochélatines** (Clemens, 2006) (Figure 6 A, n°3 et 18 et B n°20).

Cet aspect du rôle de la vacuole dans la détoxification des métaux lourds, et en particulier dans la détoxification du cadmium, est plus amplement développé dans la suite de cette synthèse bibliographique (0

Le stress cadmium chez les plantes).

### ***III - Pourquoi s'intéresser au cadmium ?***

#### **III.1 - Introduction**

##### **III.1.1 - Historique**

Le cadmium (Cd) fut **découvert en 1817** par Friedrich Strohmeyer à partir de calamine, carbonate de zinc extrait près de Cadmée, une citadelle grec. Une découverte tardive puisqu'il s'agit d'un élément relativement rare dans la croûte terrestre de 0,15 à 0,2 mg/kg (Fleischer 1974 ; Hiatt 1975). Les caractéristiques physico-chimiques du cadmium étaient inconnues jusqu'à la fin du 19ème siècle. Il commence à être **commercialisé vers 1910**. En quelques dizaines d'années, 65 % de la production mondiale de cadmium est usinée, le cadmium est considéré comme le **métal du XXe siècle**. Il est utilisé dans les batteries, pour protéger l'acier **contre la corrosion** ou encore **comme stabilisant** pour les plastiques et comme **pigment** dans les produits céramiques (Jarup 2002). Mais il fut aussi utilisé dans de plus illustres compositions en tant que rouge, orange et jaune de cadmium pour remplacer le Vermillon et d'autres teintes dans les œuvres du fauvisme, spécialement celles de Matisse (ex : Noir et Rouge).

##### **III.1.2 - Définition**

Le **Cd est un métal** blanc argenté, brillant, il est malléable et ductile. Chimiquement, il ressemble beaucoup au **zinc** et peut le remplacer isomorphologiquement dans presque tous les minerais (Cotton 1972; Lymburner 1974). Il appartient au groupe II B de la classification périodique des éléments. L'état d'oxydation le plus fréquent dans l'environnement est **l'ion Cd<sup>2+</sup>**. Facilement volatile, il peut réagir avec les gaz pour former des oxydes de cadmium (CdO), des carbonates (CdCO<sub>3</sub>), des hydroxydes (Cd(OH)<sub>2</sub>), des sulfures (CdS) et des chlorures (CdCl<sub>2</sub>).

Le protocole relatif aux métaux lourds de la Convention de Genève (Convention sur la pollution atmosphérique transfrontalière à longue distance, 1979) désigne, par le terme « Métaux Lourds », les métaux et leurs composés qui sont stables et ont une masse volumique

supérieure à  $4,5 \text{ g.cm}^{-3}$ . Quarante et un métaux correspondent à cette définition dont le cadmium. Cependant, dans la plupart des cas, l'appellation «métaux lourds» est une appellation courante qui n'a ni fondement scientifique, ni application juridique et signale des éléments ayant une toxicité avérée pour l'Homme. Le terme «**métaux lourds**» désignera alors les métaux n'ayant **pas de fonction biologique connue**. Ils sont purement toxiques pour les êtres vivants et sont capables d'induire plusieurs pathologies (Valko *et al.* 2005). Il s'agit du cadmium (Cd), du plomb (Pb), du mercure (Hg), de l'arsenic (As), du chrome (Cr), du nickel (Ni), du titane (Ti) et de l'étain (Sn). En revanche, certains métaux sont des oligo-éléments essentiels à l'organisme et à l'entretien des fonctions biologiques à faibles doses mais ils ont des effets toxiques passé un certain seuil de concentration ; c'est le cas du cuivre (Cu), du zinc (Zn), du manganèse (Mn) et du sélénium (Se), etc.

### III.1.3 - Diffusion dans l'environnement

#### III.1.3.1 - Schéma actuel

Le cadmium (Cd) est émis dans l'environnement par des activités humaines, il est retrouvé comme contaminant dans les sédiments, l'air, l'eau (Waisberg *et al.* 2003). Les principaux **rejets sont dus aux industries** telles que la métallurgie du zinc et du plomb, les activités automobiles, les rejets ou incinérations de batteries et d'accumulateurs, l'emploi de peintures ou de pigments cadmiés, les combustions d'énergie fossiles. Mais, les rejets sont aussi dus à l'**agriculture** par l'épandage d'engrais phosphatés et de boues de stations d'épuration, au traitement des **ordures** ménagères et également à la fumée de **cigarette** (Fassett 1975; He *et al.* 2005; Jarup 2003; Trinchella *et al.* 2006).

#### III.1.3.2 - Exemple de pollution

En octobre 2010, un réservoir de stockage de déchet de l'usine de bauxite aluminium d'Ajka, située à l'ouest de la **Hongrie** s'est fissuré. Entre  $700\,000 \text{ m}^3$  et  $900\,000 \text{ m}^3$  de **boues rouges** se sont déversées sur une dizaine de kilomètres carrés. Les boues rouges sont les résidus de l'extraction d'alumine à partir du traitement de la bauxite. Elles contiennent de la soude caustique, du fer, de l'alumine, du silicium, du sodium, du calcium, du titane, du manganèse, du vanadium, du chrome hexavalent, du plomb et du cadmium. Le cumul de tous ces métaux et minéraux fait des boues rouges un déchet toxique pour la faune aquatique, les animaux domestiques et d'élevage. Par ailleurs, les boues rouges provenant du traitement de la bauxite sont très légèrement radioactives. La radioactivité naturelle renforcée des boues rouges par du

radium 226 et du thorium 232 est reconnue par l'Union Européenne. Ces boues rouges toxiques ont pollué tous les cours d'eaux environnants et même atteint le Danube.

## **III.2 - Chez l'Homme**

### **III.2.1 - Sources d'exposition chez l'Homme**

Les principales sources d'exposition au Cd chez l'homme sont **l'alimentation et le tabagisme**. Chez le fumeur, la consommation de tabac peut représenter jusqu'à 75 % de l'absorption quotidienne en cadmium. Il est responsable de la coloration jaunâtre de leurs dents. Par l'alimentation, les végétaux, dont les **légumes riches en fibres**, sont les aliments qui y contribuent le plus : environ 50 % (Jarup 2002; Satarug and Moore 2004). Les **crustacés et mollusques** représentent environ 6 % de l'exposition et les poissons 1 %. L'absorption intestinale de Cd chez l'homme est d'environ **30 µg / jour** en fonction de l'âge, du sexe, ainsi que du régime alimentaire (Jarup 2002; Satarug and Moore 2004).

L'efficacité de l'**absorption** du Cd est dépendante des conditions d'exposition. Cinq pour cent du métal ingéré est absorbé par le tractus gastro-intestinal sous forme de sel, 90% du Cd inhalé est absorbé par voie pulmonaire (Jarup 2002). **Moins de 10%** du Cd absorbé est **excrété** dans l'urine et les fèces, ce qui explique les différents dommages cellulaires suite à une exposition chronique (Jarup 2002). Complexé à certaines molécules, telles que les métallothionéines (MTs) la demi-vie biologique du Cd devient très longue, entre 10 et 30 ans (Goyer 1996; Stohs *et al.* 2000).

L'OMS<sup>22</sup> a fixé en 2006 une dose hebdomadaire tolérable provisoire (DHTP) de 1 µg / kg de poids corporel / jour afin de prévenir l'accumulation de cadmium à des teneurs ne dépassant pas les 50 mg / kg dans le cortex rénal correspondant à une exposition pendant 50 ans. L'exposition par l'alimentation générale, estimée pour la **population française**, est de 2,5 µg / jour (environ 5 % de la dose tolérable). La proportion d'individus (hormis les fumeurs) dont l'exposition dépasse la DHTP pour les adultes et les enfants sur le territoire français n'est donc **pas significative**.

---

<sup>22</sup> Organisation Mondiale de la Santé (OMS) est l'autorité directrice et coordonnatrice chargée de diriger l'action sanitaire mondiale, de suivre et d'apprécier les tendances en matière de santé publique au sein du système des Nations Unies.

### III.2.2 - Mécanismes cellulaires chez l'homme

N'ayant aucun rôle physiologique connu à ce jour, le Cd ne possède pas de voie d'entrée ou de sortie qui lui soit spécifique. Il traverse les membranes cellulaires en **mimant les métaux physiologiques**. Parmi les transporteurs proposés, sont identifiés :

- les transporteurs de métaux divalent de type I (DMT1) : une protéine de la membrane plasmique permettant l'import de fer. Ce transporteur a été identifié comme impliqué dans l'absorption du Cd intestinal (Barbier *et al.* 2004; Olivi *et al.* 2001; Tallkvist *et al.* 2001).
- ZIP 8 : un transporteur de zinc dans la membrane plasmique des cellules vasculaires endothéliales (Dalton *et al.* 2005; He *et al.* 2006).
- les canaux calciques permettent également l'entrée du Cd dans la cellule (Martelli *et al.* 2006).
- les protéines MRP (*Multidrug Resistance Proteins*) sont impliquées dans l'efflux de nombreux xénobiotiques. MRP2 a été démontré comme le principal transporteur intervenant dans la sortie de cadmium biliaire conjugué au glutathion (Ballatori *et al.* 2005; Dijkstra *et al.* 1996; Leslie *et al.* 2005; Paulusma *et al.* 1997).

Dans les cellules, le Cd entre en compétition avec les autres métaux comme le calcium, le fer, le cuivre et le zinc. Le cadmium induit la production et se fixe sélectivement au **glutathion** (GH) ou aux **métallothionéines** (MTs). Les complexes Cd-GH et Cd-MTs formés permettent de prendre en charge en partie la détoxification cellulaire. Le Cd est capable d'induire l'apparition de ROS par des altérations des molécules antioxydantes (SOD, CAT et GPx) (Szuster-Ciesielska *et al.*, 2000) et de l'homéostasie des métaux physiologiques (Aramini *et al.*, 1995 ; Predki and Sarkar 1994). Il est également décrit comme **inhibiteur de la réparation de l'ADN** (Waisberg *et al.*, 2003). Toutes ces actions d'inhibition sont une contribution indirecte du Cd aux effets mutagènes et/ou à la carcinogenité (Giaginis *et al.* 2006).

### III.2.3 - Les maladies affectant l'Homme

Les dommages relatifs à une exposition au cadmium se manifestent sous forme de lésions hépatiques et rénales, de dommages pulmonaires, d'anémie, par une incidence sur l'apparition de cancer et par un remodelage osseux lors d'expositions extrêmes (Horiguchi *et al.* 1994).

### III.2.3.1 - Cancer

Le Cd est classifié comme un **carcinogène** de type I par l'agence internationale pour la recherche sur le cancer et le programme national de toxicologie USA (IARC 1993; Oh *et al.* 2006; US NTP 2000; Who 1992). De nombreuses études ont démontré que ce métal peut induire de multiples cancers au niveau des reins, des poumons, des testicules ou de la prostate (Nawrot *et al.* 2006; Verougstraete *et al.* 2002; Waisberg *et al.* 2003).

### III.2.3.2 - Toxicité hépatique et rénale

Les lésions rénales se traduisent par une augmentation de l'excrétion de protéines de faible masse molaire (**protéinurie tubulaire**) pouvant évoluer vers des dommages glomérulaires avec une forte diminution de l'efficacité de la filtration glomérulaire. Le système rénal fortement altéré se caractérise par une excrétion urinaire de protéines de grand poids moléculaire, une augmentation de l'excrétion urinaire de glucose, d'acides aminés, de calcium et d'une réduction de la capacité de concentration des reins. Le Cd inhibe la réabsorption de calcium en bloquant les canaux calciques situés dans le tubule distal ; cela conduit à une hypercalcinurie et à la formation de **caillots** (Barbier *et al.* 2004). Le Cd absorbé, *via* les voies gastro-intestinale ou pulmonaire peut aboutir au foie par la circulation sanguine et s'y complexe à diverses protéines comme l'albumine. Ce qui rend son élimination d'autant plus difficile.

### III.2.3.3 - Toxicité pulmonaire

C'est par la consommation de **tabac** ou du fait d'activités professionnelles à risque liées au cadmium qu'il atteint la voie pulmonaire. Le taux de Cd présent dans le tabac est élevé, il varie entre 0,5 à 1 µg / cigarette. Environ 10% de l'oxyde de Cd inhalé se dépose dans les alvéoles pulmonaires et entraîne le développement de **fibroses** interstitielles, d'**emphysèmes** (Hart *et al.* 2001) et d'adénocarcinomes pulmonaires (Waalkes 2003). En comparaison aux non-fumeurs, les fumeurs ont une concentration sanguine en Cd 4 à 5 fois plus élevée et ils accumulent 2 à 3 fois plus de Cd dans les reins (Satarug and Moore 2004).

### III.2.3.4 - Autres maladies

Le stress oxydant généré par le cadmium pourrait être un facteur important dans plusieurs **troubles neurologiques** tels que les maladies d'Alzheimer et de Parkinson (Watjen and Beyersmann 2004), mais également dans la formation d'**altération du système cardio-vasculaire**.

### III.2.3.5 - Le syndrome d'Itaï-Itaï (littéralement « j'ai mal-j'ai mal »)

La forme la plus sévère d'intoxication chronique au Cd, observée chez l'humain, est nommée syndrome d'Itaï-Itaï. Ce syndrome endémique de la région de la rivière Jinzu, dans la préfecture de Toyama au Japon, a été causé par un rejet de sous-produit de la production de zinc dans la rivière. Le syndrome d'Itaï-Itaï se manifeste par une décalcification osseuse (**ostéomalacie**) et une diminution de la masse osseuse (**ostéoporose**) associées à un dysfonctionnement des reins. Au stade le plus avancé de la maladie, les os se brisent au moindre choc occasionnant de multiples **fractures** extrêmement douloureuses qui sont à l'origine du nom de la maladie.

## III.3 - Conclusion sur le cadmium

Nous avons vu dans cette partie que l'industrialisation croissante de ces dernières décennies est à l'origine de la libération dans la nature de quantités importantes de cadmium (Cd). La **contamination des écosystèmes**, aquatiques ou terrestres, est soit directe (épandage d'engrais, exploitations minières, accident ...), soit une conséquence suite à la libération dans l'atmosphère des métaux (*via* la combustion d'énergie fossile par exemple). Tous les milieux peuvent être touchés, et particulièrement les eaux. Les **concentrations en Cd dans les sols** sont très variables et sont comprises dans un intervalle de 0,04 et 35  $\mu\text{M}$  (Sanita di Toppi & Gabrielli, 1999). La plupart des sols présentent une concentration en cadmium inférieure à 0,32  $\mu\text{M}$ . Une terre est considérée comme modérément polluée si la concentration en cadmium est comprise entre 0,32  $\mu\text{M}$  et 1  $\mu\text{M}$ . Au-delà d'une concentration de 1  $\mu\text{M}$ , le sol est décrit comme fortement pollué, et pour les cas extrêmes, seules les espèces végétales hyper-accumulatrices peuvent s'y développer.

Avec l'augmentation de la durée de vie, l'enjeu majeur pour la recherche biomédicale est la compréhension et la prévention des maladies neurodégénératives, des cancers ou des maladies cardio-vasculaires qui occupent la première place dans les causes de mortalité en occident. Le cadmium pourrait être lié et avoir une incidence sur toutes ces maladies. Les **plantes** sont capables d'absorber le cadmium (Grant *et al.*, 2008). Elles sont des pistes de réponse pour **comprendre et exploiter les mécanismes de détoxification** des métaux lourds.



## ***IV - Le stress cadmium chez les plantes***

Dans la plante, le cadmium est toxique, délétère. Il **affecte de nombreuses fonctions** physiologiques telles que la photosynthèse, le métabolisme de l'azote ou l'assimilation des nutriments (Sanita di Toppi & Gabrielli, 1999). Le cadmium est décrit pour être à l'origine d'une **dérégulation de la balance hydrique** (Poschenrieder *et al.*, 1989), en particulier *via* son homologie avec le calcium. Bien qu'il ne participe pas directement à leur formation, la production d'espèces réactives de l'oxygène et sa capacité à lier l'ADN sont susceptibles de modifier l'expression des gènes (Deckert, 2005).

### ***IV.1 - Distribution du cadmium dans la plante***

#### **IV.1.1 - Entrée : Le système racinaire**

L'assimilation du cadmium par les plantes se fait, exclusivement, par les **racines**. Des **transporteurs ioniques** ( $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  par exemple) suffisamment peu spécifiques permettent le passage du cadmium. Une concentration importante d'éléments ioniques dans le sol contribuera, par compétition, à limiter l'entrée du cadmium dans les racines (Clemens, 2006). La biodisponibilité du métal dans le sol est soumise à de nombreux facteurs tels que le pH, la quantité de matières organiques, la température, ou encore la concentration en ions. Il n'existe pas de règle de proportionnalité entre la concentration des métaux lourds dans le sol et leur concentration dans les végétaux.

Comme chez l'homme, chez les plantes, plusieurs transporteurs ont été identifiés pour assurer le transport du cadmium. Chez le blé, le transporteur de calcium LCT1 (*Low-affinity Cation Transporter 1*) semble être impliqué. Sa surexpression en système levures rend celles-ci hypersensibles au cadmium (Clemens *et al.*, 1998). Le transport de cadmium par LCT1 *in planta* n'a toutefois pas pu être confirmé (Forestier *et al.*, 1998 ; Perfus-Barbeoch *et al.*, 2002). Chez *Arabidopsis*, l'homologue de LCT1 n'a pas été identifié. Mais une autre famille de transporteurs de métaux, les **ZIP** (*ZRT/IRT-like Protein*), semble impliquée. Elle a été décrite pour être la principale voie d'assimilation du fer dans la plante (Curie & Briat, 2003 ; Vert *et al.*, 2002, Figure 8 (1)). De part leur faible spécificité, ils transportent également du zinc, du manganèse, du cobalt ou du cadmium (Korshunova *et al.*, 1999). Le transport du cadmium par des protéines de type ZIP a été confirmé chez les mammifères (Dalton *et al.*, 2005). Le transport du zinc par certaines protéines (ZIP1, ZIP2 et ZIP3) semble partiellement inhibé par le cadmium en système levure (Grotz *et al.*, 1998). Ces résultats attestent la compétition entre les

ions métalliques lors de leur assimilation. Toutefois, tous les transporteurs de cette famille ne sont pas à la même enseigne, ainsi **IRT1**, a été mis en évidence pour sa capacité à transporter le cadmium (Korshunova *et al.*, 1999). L'influence de la concentration d'autres métaux sur IRT1 a également été montrée puisque l'expression d'IRT1 est induite par une carence en fer (Connolly *et al.*, 2002).

L'accumulation de cadmium dans la plante semble résulter exclusivement de transporteurs suffisamment peu spécifiques pour permettre au cadmium d'être transporté. Toutefois, l'existence d'un écotype particulier de **l'espèce hyper-accumulatrice** *Thlaspi caerulescens* (écotype Ganges) bouscule cette hypothèse. Même en large excès de  $\text{Zn}^{2+}$ , la constante de Michaelis associée au cadmium ( $K_{m[\text{Cd}]} = 0,2 \mu\text{M}$ ) reste relativement faible (Lombi *et al.*, 2001). Les auteurs concluent à l'existence chez cette espèce d'un transporteur spécifique du cadmium. Seul exemple de la littérature, chez la **diatomée** marine *Thalassiosira weissflogii*, il existe une enzyme (anhydrase carboxique) contenant un site de fixation pour le cadmium (Lane *et al.*, 2005). Il s'agit de l'unique cas connu d'un organisme pour lequel la présence de cadmium intracellulaire correspond à une fonction physiologique et impliquerait l'existence de transporteurs spécifiques de ce métal.

Une fois extraits du sol et chélatés dans les racines, la répartition tissulaire des ions métalliques dans la plante dépend de la nature du métal et de l'espèce végétale considérée. Le cadmium, plus que l'arsenic, présente une propension plus favorable à atteindre les feuilles. Les fruits et les graines sont généralement les organes les moins exposés (Clemens, 2006).

#### IV.1.2 - Transport par le système vasculaire

Chez certaines plantes, dites hyperaccumulatrices, l'importante capacité à concentrer le métal dans les feuilles est associée à un phénotype de tolérance accrue. La distribution du cadmium, dans divers tissus, chez les autres plantes dépend classiquement de la capacité de la plante à contenir son accumulation au niveau des racines. Ce point essentiel expose le caractère crucial de **seuil de concentration et de répartition de la charge** dans la résistance contre les métaux lourds. Le **système vasculaire** agit alors comme un **vecteur de distribution** et de répartition du métal.

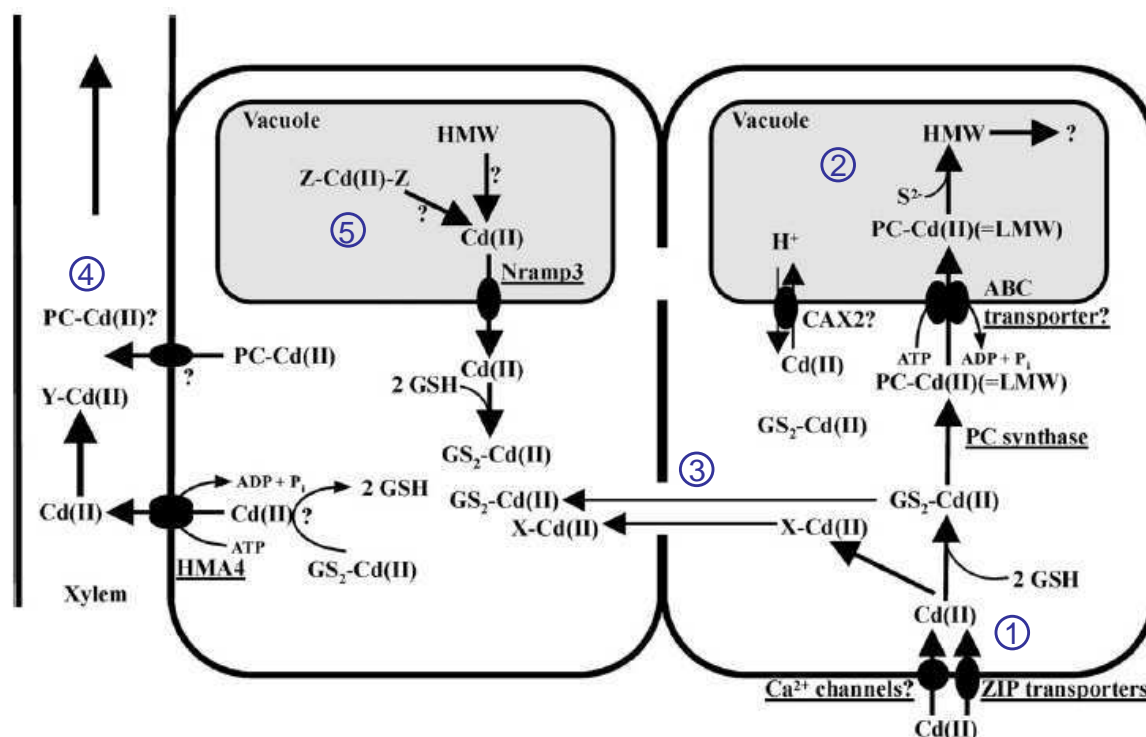
La comparaison de la répartition du cadmium entre deux cultivars de blé a montré qu'une concentration particulièrement importante de cadmium dans les graines était associée à une concentration élevée dans le phloème de l'un des écotypes (Harris & Taylor, 2004). Chez la

tomate, Chaffei *et al.* (2003) soumettent des plants à un stress cadmium transitoire. Ils réalisent une alternance de condition initiale sans stress, puis ajout de cadmium dans le milieu puis retrait (10 jours off / 7 jours on sur un milieu de culture enrichi de 20  $\mu\text{M}$  Cd / 10 jours off). À terme, ils observent une diminution du niveau d'accumulation endogène de Cd (exprimé en  $\mu\text{mol.g}^{-1}$  de matière sèche) et une reprise progressive d'un niveau normal de tous les paramètres physiologiques et métaboliques étudiés. Or, la diminution de la teneur en cadmium n'est pas due à une exsorption du métal dans le milieu. Ils en concluent qu'une fois les métaux lourds éliminés du milieu nutritif, la réversibilité des effets délétères est probablement une conséquence de la **dilution du Cd dans les tissus**. La reprise de la croissance entraîne une augmentation de masse végétative, le transport par le système vasculaire permet d'augmenter la répartition du cadmium absorbé dans les tissus.

Le chargement des métaux toxiques par le xylème peut être décomposé en trois phases (Figure 8) :

1. la **chélation** de l'ion dans le cytosol des cellules racinaires,
2. le **transport** des complexes formés, ou éventuellement de l'ion seul, à travers la voie symplastique pour aboutir à
3. la **libération** de l'ion dans le xylème.

La mobilité des métaux à l'intérieur de la plante est fortement dépendante de la présence de **chélateurs**. Leur synthèse peut être modulée en fonction de la concentration intra-cellulaire de métaux. Ils sont capables de lier les ions métalliques afin de limiter leur réactivité dans la cellule et de mieux contrôler leur dispersion (Clemens, 2006). Ces mécanismes sont primordiaux dans l'assimilation de métaux essentiels comme le zinc ou le fer. Ces mêmes mécanismes sont exploités pour la prise en charge et la répartition des métaux exclusivement toxiques comme le cadmium.



**Figure 8 :** D'après Clemens, 2006 **Principaux flux intra-cellulaires du cadmium, depuis son entrée dans les cellules racinaires jusqu'à sa libération dans le système vasculaire.** (1) Le cadmium entre par les racines via des transporteurs de métaux (ZIP) ou des canaux calciques (LCT1). Une fois dans le cytosol, les ions métalliques en excès sont chélatés. La nature du chélateur va déterminer le devenir du métal. Ce dernier peut être stocké dans la vacuole (2) ou bien exporté via la voie symplastique (3). Par la voie symplastique (3), il est alors distribué à l'ensemble de la plante par le système vasculaire. Le transport des ions passe généralement par leur complexation à des molécules de la famille des métallothionéines (X). Une fois dans le xylème, d'autres chélateurs peuvent éventuellement prendre le relais (4) (Y = nicotianamine ou acide citrique par exemple). Dans le cas d'une compartimentation vacuolaire (2), le cadmium peut traverser le tonoplast sous forme non liée, via un antiport  $\text{Ca}^{2+}$  /  $\text{H}^{+}$  (CAX2). Le cadmium peut également être délivré à la vacuole par des complexes PC-Cd (les phytochélatines, PC). Certains auteurs suggèrent également la formation d'autres complexes Cd-Z (Z = acides organiques) (5). Le confinement du cadmium dans des complexes (HMW) assurerait une séquestration à long terme du toxique, et limiterait sa re-libération vers le cytosol, notamment via des transporteurs de métaux peu spécifiques tels que NRAMP3. Source : Biochimie 88 (2006) 1707–1719

Les connaissances sur le transport et les **chélateurs** de métaux toxiques proviennent principalement de l'extrapolation des résultats obtenus à partir de travaux réalisés sur levure mais aussi des données acquises sur les plantes hyperaccumulatrices (Figure 8 (3) (4)) (Verbruggen *et al.*, 2009). Dans le cas du nickel, chez les plantes du genre *Alyssum*, une élévation de la concentration intra-cellulaire d'histidine permet d'augmenter le taux de transport du métal par le xylème. Par exemple, le facteur de multiplication est de 50 pour *Alyssum montanum* (Krämer *et al.*, 1996). D'autres travaux ont pu montrer que l'acide citrique (Senden *et al.*, 1995), la nicotianamine (Pich *et al.*, 1994 ; Mari *et al.*, 2006) ou les phytochélatines (Gong *et al.*, 2003 ; Chen *et al.*, 2006) sont susceptibles de lier des métaux pour en faciliter le

transport xylémien mais aussi phloémien. Le seul transporteur identifié à ce jour et localisé à la membrane plasmique qui permettrait un efflux des ions vers le système vasculaire est une ATPase de type P, HMA4 (*Heavy Metal transporting ATPase 4*) (Verret *et al.*, 2004).

#### IV.1.3 - Le cas particulier des trichomes

La distribution du cadmium à travers l'ensemble de la plante permet de multiplier les sites de stockage ou d'excrétion dans certains cas particuliers. Un **processus original d'élimination** a été mis en évidence chez le tabac (Choi *et al.*, 2001). Cette étude montre que des plants de tabac soumis à de fortes concentrations de cadmium présentent une augmentation du nombre de leurs trichomes<sup>23</sup>. Ces poils aériens, parfois duvet ou petites épines, sont des cellules accumulatrices particulières présentes sur les feuilles de certaines plantes. La fonction de ces trichomes varie d'une plante à l'autre, et peut être impliquée dans la défense contre les pathogènes aussi bien que dans la diffusion du menthol chez le genre *Mentha* ou la concentration d'alcaloïdes chez le genre *Cannabis*. Chez le tabac, ils sont notamment le siège de la **formation de sels de cadmium**, solides, qui sont **excrétés** (Choi *et al.*, 2004). Ce mécanisme a également été caractérisé pour des métaux essentiels, tels que le zinc, en complexe avec des carbonates de calcium et des acides organiques ou lors d'un stress salin pour éliminer le sodium en excès (Sarret *et al.*, 2006).

#### IV.2 - Mécanismes cellulaires de la détoxification du cadmium

Deux voies principales conduisent à la détoxification des ions métalliques excédentaires dans le cytosol. La première, plus spécifique des cellules racinaires, consiste en la distribution, *via* le xylème, des ions toxiques vers les parties aériennes. La seconde utilise les capacités de confinement des ions toxiques dans la vacuole. Le processus (Figure 8 (2)) peut être décomposé en trois phases :

1. la chélation des ions cytosoliques, par des métabolites particuliers, les phytochélatines(PC),
2. la translocation des complexes formés PC-Cd dans la vacuole, et enfin
3. leur neutralisation.

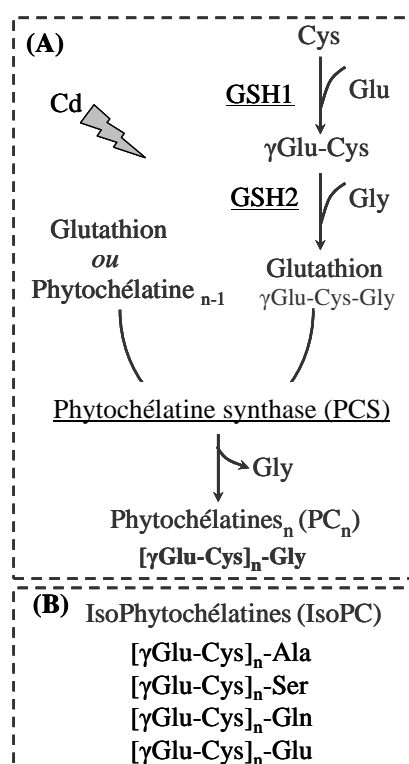
---

<sup>23</sup> Trichome est un terme issu du grec *trikhoma* qui signifie « croissance de poils ». Les trichomes sont de fines excroissances ou appendices à la surface de l'épiderme (feuilles ou tiges) des plantes.

## IV.2.1 - La chélation par les phytochélatines

### IV.2.1.1 - Structure et occurrence des phytochélatines

Les **phytochélatines** (PCs) sont des **polypeptides** de poids moléculaire compris entre 1,5 et 4 kDa dont la chaîne principale est une répétition du dipeptide  $\gamma$ -Glu-Cys (Glutamate et Cystéine) suivie par un acide aminé terminal, généralement une glycine (Gly). La structure de base des phytochélatines est  $[\gamma\text{Glu-Cys}]_n\text{-Gly}$  où  $n$  est compris entre 2 et 11, mais majoritairement il est inférieur à 5 (Rauser, 1995). Ces peptides sont représentés de façon ubiquitaire dans le règne végétal, des algues aux dicotylédones. On les retrouve également chez certaines levures, notamment *Schizosaccharomyces pombe*, mais aussi chez le ver *Caenorabditis elegans* (Vatamaniuk *et al.*, 2001). Toutefois, si la structure de base des phytochélatines reste globalement constante d'une espèce à l'autre, elle peut présenter quelques variations, notamment en ce qui concerne l'acide aminé terminal, formant alors les isophytochélatines (Figure 9 B). Cet acide aminé peut être remplacé par une alanine (*Candida glabrata* - Rauser, 1995), une sérine (riz - Klapheck *et al.*, 1994), ou un glutamate (maïs - Meuwly *et al.*, 1995). Des travaux réalisés par notre équipe au laboratoire PCV ont permis de mettre en évidence, un ensemble d'**isoformes** de phytochélatines chez *Arabidopsis* (Sarry *et al.*, 2006 ; Ducruix *et al.*, 2006). L'origine des IsoPC n'est pas connue chez *Arabidopsis*, et pourrait résulter, comme c'est le cas chez *Hordeum* (l'orge), de la synthèse d'isoglutathion. L'enzyme GSH2 catalyse dans ce cas aussi bien l'ajout d'une glycine (Gly) sur la sous-unité  $[\gamma\text{Glu-Cys}]$  que d'une Alanine (Ala), d'une serine (Ser) ou d'une glutamine (Gln).



**Figure 9 : Synthèse des phytochélatines et des isophytochélatines.**

**(A) :** Le glutathion est synthétisé sous les actions successives des deux enzymes GSH1 et GSH2 à partir de cystéine (Cys), de glutamate (Glu) et de glycine (Gly). La phytochélatine synthase (PCS) catalyse ensuite la liaison entre 2 glutathions ou l'ajout d'une sous-unité  $[\gamma\text{Glu-Cys}]$  sur une chaîne de phytochélatine (PC). La PCS permet de former des « polymères » de glutathion ( $\text{PC}_n$ ), de formule  $[\gamma\text{Glu-Cys}]_n\text{-Gly}$ .

**(B) :** Suivant l'espèce végétale et le stress métallique considéré, il arrive que des isophytochélatines (IsoPC) apparaissent. Ces IsoPC sont des PC dont l'acide aminé terminal n'est pas une glycine mais une alanine (Ala), une sérine (Ser), une glutamine (Gln) ou un glutamate (Glu).

#### IV.2.1.2 - Rôle des phytochélatines

Les PCs sont des **agents de chélation** naturels, des métallothionéines de classe III. Elles sont responsables de la tolérance des plantes aux ions métalliques, notamment au cadmium ( $\text{Cd}^{2+}$ ). Des mutants affectés dans la synthèse des PC présentent un phénotype d'hypersensibilité à plusieurs métaux lourds ( $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  ; Howden *et al.*, 1995).

Les **thiols**, portés par les cystéines du glutathion, permettent la chélation de certaines cations divalents ; ce qui conduit à diminuer la concentration de métaux libres dans le cytosol et à limiter leur grande réactivité. Certains travaux mentionnent, pour des lignées surexprimant les phytochélatines, une augmentation de la concentration en cadmium cellulaire associée à un phénotype de résistance (Clemens *et al.*, 1999). L'hyperaccumulation du cadmium semble être un phénomène rare dans le règne végétal. Cependant, des hyperaccumulateurs de zinc sont capables d'extraire plus de cadmium que des plantes non-accumulatrices. Cette co-accumulation a été observée pour différentes espèces incluant les genres *Thlaspi*, *Colochortus* et *Alyssum*. Ce phénomène est attribué à un système non spécifique de détoxification métallique. Une plante est dite **hyperaccumulatrice** de cadmium pour des concentrations supérieures ou égales à 0,01 % des concentrations de zinc hyperaccumulé (Source ADEME : Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie, Moulis & Thévenod, 2010).

#### IV.2.1.3 - Synthèse des phytochélatines – induction de la synthèse par le cadmium

Les phytochélatines sont synthétisées par une suite de polymérisation du glutathion grâce à 3 enzymes (Figure 9 A). Les **glutathione synthétases** 1 et 2 catalysent la formation du glutathion puis la **phytochélatine synthase** (PCS) assemble des chaînes de glutathion pour former les phytochélatines. La PCS fut purifiée et caractérisée pour la première fois à partir de *Silene cucubalus* (Grill *et al.*, 1989). La première isoforme caractérisée sur un plan moléculaire, PCS1, a été simultanément clonée par 3 équipes indépendantes en 1999 (Vatamaniuk *et al.*, 1999 ; Clemens *et al.*, 1999 ; Ha *et al.*, 1999). Plus tard, un variant, PCS2, a également pu être identifié et cloné (Cazale & Clemens, 2001). Sa surexpression ne permettant pas de restaurer un phénotype sauvage chez un mutant *pcs1*, PCS2 semble moins déterminante dans la réponse au stress cadmium (Lee & Kang, 2005).

La régulation de la **synthèse** et de l'activité de la phytochélatine synthase est sous le **contrôle des métaux** présents en excès dans le cytosol. Le cadmium est l'ion le plus activateur, puis viennent, par potentiel d'activation décroissant, l'argent, le plomb, le zinc, le cuivre, le mercure et l'or (Cobbett, 2000). Or, ce n'est pas une liaison directe du cadmium à un site spécifique de l'enzyme qui permet son activation, mais plutôt l'état réduit du substrat, le glutathion, en thiolate de glutathion :  $\text{Cd}(\text{GS})_2$  ou  $\text{Zn}(\text{GS})_2$  (Vatamaniuk *et al.*, 2000).

D'autres auteurs affirment que l'expression de PCS1 est constante même au cours d'un stress (Cobbett, 2000). Les travaux de notre équipe tendent plus vers une possible régulation

transcriptionnelle directe ou indirecte de la PCS par le cadmium. Des expériences d'analyse transcriptomique sur puce à ADN montrent une augmentation transitoire de la quantité d'ARNm codant pour PCS1 pour les temps courts d'exposition au cadmium (Herbette *et al.*, 2006).

#### IV.2.2 - Translocation et neutralisation dans la vacuole

##### IV.2.2.1 - Transport du cadmium dans la vacuole

Une accumulation conjointe de phytochélatines et de cadmium dans la vacuole végétale a été établie lors d'un stress (Vogeli-Lange & Wagner, 1990) (Figure 8 (2)). La totalité du cadmium et des phytochélatines présentes dans les cellules et les vacuoles purifiées ont été dosées. Les complexes PC-Cd formés dans le cytosol vont subir un influx vacuolaire via des transporteurs tonoplastiques. En dépit de travaux visant à les identifier (Bovet *et al.*, 2005), de tels transporteurs n'ont jamais été caractérisés chez les plantes jusqu'à très récemment. L'observation de ces mêmes mécanismes chez les levures, *Saccharomyces cerevisiae* et *Schizosaccharomyces pombe* ouvre des pistes sur la nature de ces protéines. Chez ces levures, suite à la chélation cytosolique du cadmium par du glutathion (GS)<sub>2</sub>Cd ou des PC, les complexes sont transloqués dans la vacuole, *via* des **ATP Binding Cassette** (ABC). Ces transporteurs sont nommés YCF1 (*Yeast Cadmium Factor 1*) chez *Saccharomyces cerevisiae* (Li *et al.*, 1997) et HMT1 (*Heavy Metal Transporter 1*) chez *Schizosaccharomyces pombe* (Ortiz *et al.*, 1992). Ils sont essentiels à la résistance au cadmium puisque des levures mutées pour ces protéines présentent un phénotype d'hypersensibilité au cadmium (Szczycka *et al.*, 1994). Les transporteurs ABC sont donc les candidats les plus favorables pour un tel transport chez les plantes. Ainsi, des travaux sur le transport de l'arsenic (As) chez *Arabidopsis* dans l'équipe de Martinoia ont permis d'identifier ABCC1 (MRP1) et ABCC2 (MRP2) comme des transporteurs de complexes PC-As (Song *et al.*, 2010). Concomitant à cette annonce, un second papier est paru désignant ABCC2 (**AtMRP2**) comme un transporteur de complexes PC-Cd chez *Schizosaccharomyces pombe* par des approches de complémentation fonctionnelle (Mendoza-Còzatl *et al.*, 2010).

Le mystère du transport du cadmium sous forme de complexes PC-Cd est enfin résolu chez les plantes. D'autres transporteurs tonoplastiques ont été caractérisés pour leur implication dans la séquestration vacuolaire du cadmium seul. Une activité de type antiport  $\text{Cd}^{2+}/\text{H}^{+}$  a pu être détectée dans des fractions microsomales de racine d'avoine (Salt & Wagner, 1993). En 2007, cette hypothèse a été confirmée par la découverte de deux antiports  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$  de la famille **CaX** (*Cation eXchanger*), localisés à la membrane vacuolaire. Il s'agit de CAX1, de relativement haute affinité ( $K_m = 13,1 \mu\text{M}$ ), et de CAX2, de plus basse affinité ( $K_m > 100 \mu\text{M}$ ) (Hirschi *et al.*, 1996 ; Koren'kov *et al.*, 2007 ; Koren'kov *et al.*, 2007b).



#### IV.2.2.2 - Neutralisation du cadmium vacuolaire

Une fois dans la vacuole, quel est le devenir du cadmium ? La stabilisation du cadmium en vue de sa neutralisation (Figure 8 (2 & 5)) pourrait consister en une chélation des ions par des acides organiques tels que le citrate, l'oxalate ou le malate. Cette hypothèse, proposée à l'origine pour expliquer la compartimentation vacuolaire du Zn (Mathys, 1977), fut reprise pour le cadmium (Krotz *et al.*, 1989) sans toutefois être démontrée. Un travail original de simulation informatique de la spéciation du cadmium cellulaire (Wang *et al.*, 1991) a suggéré une répartition du Cd entre **des ligands protéiques** (PC) et **des ligands de type acides organiques** (AO), dépendante de la concentration en Cd et en soufre et du pH du milieu considéré. Ainsi, pour des concentrations de l'ordre du micromolaire ( $\mu\text{M}$ ) au millimolaire ( $\text{mM}$ ), la formation de complexes PC-Cd serait favorisée, alors que pour des concentrations nanomolaires ( $\text{nM}$ ), les complexes AO-Cd seraient majoritaires (dont citrate-Cd quasi exclusivement).

Toutefois, l'observation de *S. pombe* exposée à du cadmium révèle deux types de complexes PC-Cd, résolus par gel-filtration. Des complexes de faible poids moléculaire (**LMW**, *Low Molecular Weight*), comprenant essentiellement des  $\text{PC}_2$  et des  $\text{PC}_3$ , et d'autres de haut poids moléculaire (**HMW**, *Heavy Molecular Weight*) incorporant du soufre, se forment au sein des vacuoles (Dameron *et al.*, 1989). L'existence de ces deux types de complexes est moins claire chez les plantes (Rauser, 1995).

La transformation de ces complexes des faibles vers les hauts poids moléculaires permettrait de diminuer le pouvoir osmotique des molécules séquestrées et d'augmenter la stabilité des complexes, notamment par l'incorporation de soufre. Le rapport  $\text{S}^{2-} / \text{Cd}$ , d'une espèce à l'autre, est compris entre 0,15 et 0,40 et peut aller jusqu'à 1. L'équimolarité entre le soufre et le cadmium entraîne la cristallisation des HMW et donc la précipitation de particules de sulfure de cadmium ( $\text{CdS}$ ). Ces structures  $\text{CdS}$  associées à des phytochélatines sont retrouvées chez les levures comme chez les plantes (Reese *et al.*, 1992) et constitueraient la forme de stockage privilégiée du cadmium dans la vacuole.

#### IV.2.3 - Conclusion sur les mécanismes de détoxification du cadmium

Les mécanismes de détoxification cellulaire des ions métalliques et du cadmium mettent en œuvre des acteurs métaboliques bien caractérisés. Les acteurs protéiques sont, pour l'instant, moins bien identifiés chez *Arabidopsis*. On peut quand même citer les travaux sur une protéine SBP1 pour Selenium binding Protein 1 (Sarry *et al.*, 2006 ; Dutilleul *et al.*, 2008 ; Hugouvieux *et al.*, 2009) et les récentes découvertes sur les MRP, transporteur de complexes PC-métaux (Song *et al.*, 2010 ; Mendoza-Còzatl *et al.*, 2010). Si l'on prend l'exemple de la diatome marine, il reste à découvrir d'**autres protéines** telles que des transporteurs, des enzymes ou des

chaperonnes impliquées dans les mécanismes de détoxification du cadmium. Un des moyens d'identifier ces protéines est d'entreprendre une étude exhaustive des protéines de la vacuole. Différentes approches de protéomique sont envisageables pour explorer le rôle de détoxification mais aussi éclaircir le rôle lytique des vacuoles.

## ***V - Etude protéomique***

### **V.1 - L'analyse en spectrométrie de masse**

#### **V.1.1 - Introduction**

##### **V.1.1.1 - Définition**

La **spectrométrie de masse** (MS - *mass spectrometry*) est une méthode analytique qui permet de déterminer la masse moléculaire<sup>24</sup> d'un composé chimique ou biologique. Elle apporte des informations sur la composition et la structure d'un échantillon de constitution inconnue. Appliquée à l'analyse de macromolécules organiques de l'ordre du kiloDalton<sup>25</sup> (kDa), la spectrométrie de masse s'attelle à l'identification des protéines (de 10 à 100 kDa), et caractérise le domaine de la **protéomique**. Le spectromètre de masse sépare les protéines en fonction de leur rapport masse sur charge ( $m/z$ ). Les molécules à analyser sont ionisées et les ions sont envoyés vers l'analyseur par un champ électrique qui sépare ces ions en fonction de leur rapport  $m/z$ . Le détecteur envoie alors l'information vers l'ordinateur pour être analysée. Les sources, analyseurs et détecteurs existants peuvent être associés de manière différente et ainsi créer une grande variété d'appareils. Le choix d'un type de source ou d'un type d'analyseur dépendra de la nature de l'échantillon à analyser et du type de données souhaité (sensibilité, résolution et précision de mesure).

##### **V.1.1.1 - Concept**

Le concept de l'analyse protéomique a été introduit en 1998 par Anderson et Anderson, qui le définissent comme l'analyse quantitative des niveaux d'expression des protéines, visant à déchiffrer les mécanismes du contrôle de l'expression génique (Anderson & Anderson, 1998). La protéomique profite des qualités essentielles de sélectivité et de sensibilité (inférieure à la femto-mole) de la MS et peut être envisagée à différentes échelles :

---

<sup>24</sup> Masse moléculaire = masse de l'ensemble des atomes d'une molécule

<sup>25</sup> Un dalton est défini comme 1/12e de la masse d'un atome de carbone 12, soit 1,67 E -24 g.

- ✓ Exhaustives pour détecter le plus grand nombre possible de protéines d'un échantillon complexe,
- ✓ Différentielles pour comparer des extraits protéiques d'origine cellulaire différente et mettre en évidence, par exemple, des marqueurs biologiques,
- ✓ Ciblées pour mettre en évidence les protéines impliquées dans une fonction cellulaire donnée.

Dans un premier temps, la protéomique s'attache à identifier les protéines extraites d'une culture cellulaire ou d'un organisme, leur localisation subcellulaire et leurs modifications post-traductionnelles (PTMs). Ce premier niveau de caractérisation d'un protéome est nommé **identification**. Dans un second temps, tâche souvent plus complexe, l'objectif est d'évaluer une dynamique du protéome en fonction d'un état de développement, d'un environnement, d'un état physiologique ou pathologique. Le but étant de quantifier des variations de taux d'expression des protéines : c'est la **quantification**. Enfin, lorsqu'il s'agit de qualifier les fonctions et interactions avec d'autres protéines, de l'ADN, de l'ARN ou encore d'autres substances, cette exploration introduit les termes de **protéomique fonctionnelle** et d'**interactome**.

### V.1.2 - L'identification

#### V.1.2.1 - Avancées historiques

L'analyse des protéines par spectrométrie de masse a émergé grâce à l'introduction de techniques d'**ionisation-désorption**<sup>26</sup> dites **douces** car elles engendrent peu ou pas de fragmentation des molécules durant le processus. Ces méthodes, fréquemment utilisées en biologie, sont la désorption-ionisation laser assistée par matrice (MALDI) et l'ionisation électrospray (*electrospray ionization*-ESI). Développées par Tanaka et Fenn au cours des années 1980 (Prix Nobel 2002) (Fenn *et al.*, 1989 ; Tabet et Rebuffat, 2003), l'ESI et le MALDI ont permis de faire connaître à l'étude des protéines un essor considérable (pour revue voir Hommerson *et al.*, 2011).

Certains défis significatifs en protéomique proviennent de la grande **complexité des systèmes biologiques et de la gamme de concentration** des protéines dans ces systèmes. L'exemple du protéome du plasma ou du sérum est souvent cité pour illustrer cette demande croissante en gamme dynamique. En effet, dans ces systèmes, toutes les protéines exprimées

---

<sup>26</sup> Ionisation-désorption = vaporisation d'échantillons liquides à l'état gazeux qui produit de façon générale des ions « pseudo-moléculaires » de type  $MH^+$  ou  $MH$

sont potentiellement présentes et couvrent une gamme de concentration d'au moins 10 ordres de grandeur ; ce qui excède la gamme dynamique de tout instrument de spectrométrie de masse utilisé comme unique méthode analytique (Anderson & Anderson, 2002). Après digestion enzymatique, chaque protéine est convertie en quelques dizaines de peptides ; ce qui augmente encore la complexité du mélange. Si on ajoute à cela la présence de **multiples formes d'une même protéine** (isoformes, PTMs, formes tronquées par maturation), l'analyse protéomique pose de nombreux défis analytiques. Une stratégie de **fractionnement** peut être utilisée, comme par exemple le couplage d'une séparation par chromatographie en phase liquide avec la MS (Washburn *et al.*, 2001 ; Wolters *et al.*, 2001).

Pour répondre aux exigences de plus en plus importantes en termes de sensibilité, de gamme dynamique et de précision, de nouveaux instruments ont fait leur apparition. Depuis sa commercialisation en 2005, l'**Orbitrap** est devenu l'un des instruments de choix dans de nombreuses applications protéomiques. Le piégeage orbital fut mis en place pour la première fois en 1923 par Kingdon pour capturer les ions en les faisant tourner dans l'orbite d'une électrode centrale (Comisarow & Marshall, 1976). En 2000, Makarov a décrit l'Orbitrap comme un nouvel analyseur de spectrométrie de masse dérivé du piégeage orbital (Makarov, 2000 ; pour revue Perry, Cooks, and Noll 2008).

#### V.1.2.2 - Le principe – comment ?

Comme mentionné dans la partie « matériels et méthodes », afin de mener à bien une identification, l'échantillon biologique protéique suit classiquement le processus suivant :

- Digestion sous forme de peptides
- Introduction dans le système par chromatographie liquide
- Ionisation – désorption au niveau de la source du spectromètre de masse
- Analyse MS, MS/MS, SRM... (instrument dépendant (Figure 10))
- Détection du signal
- Traitement du signal par des systèmes informatisés

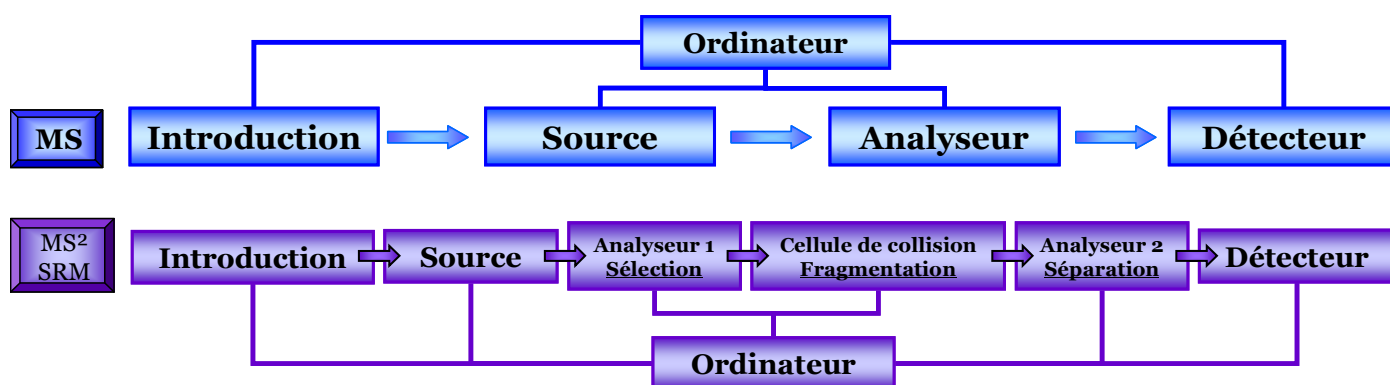
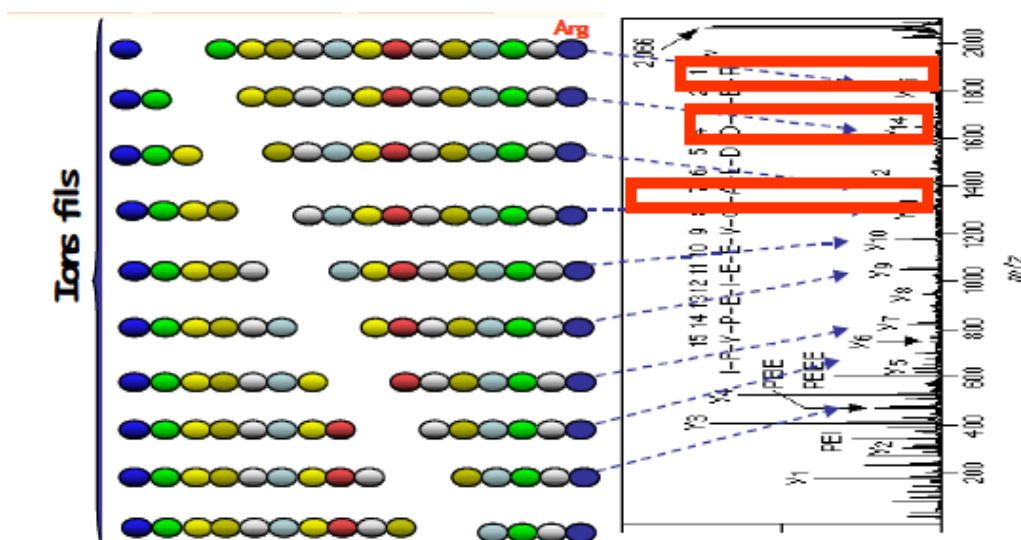


Figure 10 : Schéma de l'ensemble des systèmes instrumentaux dédiés à la MS, MS<sup>2</sup>, et SRM

Un spectromètre de masse est classiquement composé de trois grandes parties : la source d'ionisation, l'analyseur et le détecteur (Figure 10). Une molécule subit une ionisation au niveau de la **source**. Au niveau de l'**analyseur**, les ions sont séparés en fonction de leur rapport masse sur charge ( $m/z$ ). Enfin, le détecteur collecte ces ions, quantifie leur intensité et amplifie le signal. Ces dernières étapes se déroulent dans un vide poussé pour éviter toute collision entre les ions et les molécules de gaz. Après le **détecteur**, un système informatique permet le traitement des données et génère un spectre de masse qui précise la variation du courant ionique observée en fonction du rapport  $m/z$  et permet de déterminer la masse moléculaire de l'espèce analysée. Les principes techniques des instruments sont détaillés en annexe (annexe 1).

L'identification d'une protéine nécessite d'obtenir des **informations de séquence** par une analyse de spectrométrie de masse en tandem des peptides protéolytiques. Les peptides protéolytiques sous leur forme ionisée sont nommés ions parents. Les ions parents (ou précurseurs) subissent une **fragmentation** induite par collision (CID cf. annexe 1) grâce à la présence de molécule de gaz neutre (dans la cellule de collision, Figure 11). La collision génère alors une multiplicité d'ions fragments appelés ions fils qui forment le profil de fragmentation des peptides et / ou protéines.



**Figure 11 : Profil de fragmentation du peptide IPYPEIEEVGALDDIER.** À gauche, un schéma représente les possibles ions fragments (ions fils) où chaque acide aminé de la séquence peptidique est symbolisé par une perle de couleur. À droite, le spectre expérimental annoté.

Des logiciels ont été développés, permettant d'**interpréter** automatiquement les spectres de fragmentation pour leur associer des séquences en acides aminés rendant compte des ions fragments observés. Les **spectres** peptidiques expérimentaux, issus de l'analyse MS/MS, sont confrontés à l'aide du logiciel Mascot<sup>®</sup> (cf. annexe 1) aux spectres théoriques issus d'une digestion et d'une fragmentation « in-silico » des séquences protéiques répertoriées dans les banques de données protéiques. Ces banques sont elles-mêmes issues des données de séquençage des génomes. La correspondance entre le spectre expérimental et le spectre théorique est définie par un degré de similitude. Au laboratoire EDyP, ces similitudes des différents spectres sont ensuite vérifiées par une analyse dans IRMA, puis exporté *via* HEIDI dans une base de données (cf. matériels et méthodes).

### V.1.2.3 - L'introduction : nanoHPLC

La complexité des échantillons et leur gamme dynamique de concentrations constituent un challenge important dans les analyses protéomiques. Or, la MS seule ne peut tolérer qu'une complexité relativement faible, c'est pourquoi il est nécessaire de limiter le nombre de composés à analyser en même temps.

La **chromatographie en phase liquide** (HPLC) est une **méthode de séparation** des composés d'un échantillon entre deux phases, une phase solide stationnaire et une phase liquide mobile. La séparation est fondée sur la différence de distribution des espèces entre les deux phases non miscibles : la stationnaire (silice vierge ou greffée, polymère moléculaire ou

échangeur d'ions) et la mobile (phase liquide constituée par un solvant pur ou plus souvent par un mélange de solvants). Les forces d'interactions générées par la phase stationnaire permettent d'augmenter la sélectivité afin de pouvoir identifier et quantifier les peptides en MS.

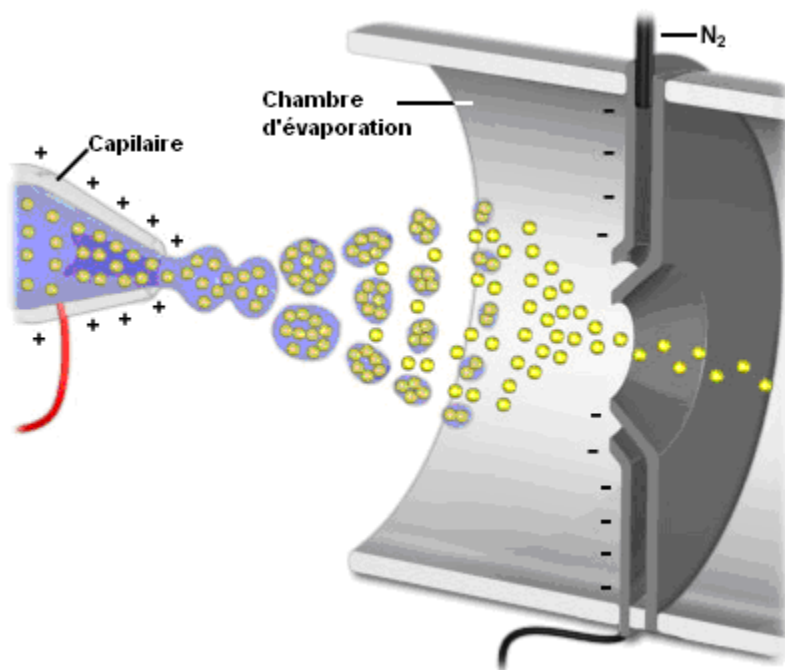
Les diverses propriétés physico-chimiques des peptides (charge, pI, hydrophobie, taille) leur permettent d'être séparés par presque tous les modes de séparation en phase liquide. La capacité de l'HPLC à séparer des biomolécules fragiles de hauts poids moléculaires rend son application incontournable lorsque des fluides biologiques sont analysés. Grace aux avancées des méthodes d'ionisation et de l'instrumentation, son **couplage à la MS** en fait une technologie puissante pour la caractérisation et l'identification des peptides et des protéines dans les mélanges complexes (Dolan *et al.*, 1999 ; Kebarle and Verkerk, 2009).

Au laboratoire EDyP, nous disposons d'instruments de chromatographie liquide de type nanoHPLC (Dionex®) à polarité de phase inverse. Les échantillons, digérés par la trypsine sous forme de peptides, sont séparés en fonction de leur hydrophobicité. La chaîne LC comprenant des systèmes de vannes, dégazeurs et une précolonne, l'échantillon est dessalé, concentré et fractionné avant son introduction dans la source par une jonction liquide.

#### V.1.2.4 - La source : ESI

**L'ionisation par électrospray** a été développée par Fenn et ses collaborateurs et décrite pour la première fois en 1985 (Whitehouse *et al.*, 1985). L'ESI a été, depuis, très largement utilisée en protéomique pour la caractérisation de biomolécules spécifiques (Fenn *et al.*, 1989 ; Larsen *et al.*, 1991 ; Loo *et al.*, 1992).

L'ionisation électrospray génère à partir d'un échantillon en solution, à pression atmosphérique, des ions en phase gazeuse (Figure 12). L'application d'un champ électrique intense à un liquide en mouvement résulte en la formation d'un spray de petites gouttelettes d'ions préformés en solution. Au niveau de la source chauffée, sous l'effet d'un champ électrique et grâce à l'assistance éventuelle d'un courant gazeux coaxial, l'évaporation du solvant diminue le volume des gouttelettes. Elles forment un nuage de fines gouttelettes (**spray**), jusqu'au moment où l'énergie due aux interactions Coulombiennes répulsives provoque l'explosion des microgouttelettes. Ce type d'ionisation, l'électronébulisation, donne lieu à la formation d'ions essentiellement multichargés de type  $(M+nH)^{n+}$ , on parle d'ionisation "douce".



**Figure 12 : Processus d'electrospray.** L'évaporation progressive du solvant contenu dans les gouttes permet la désorption de l'analyte et la formation d'ions multichargés.

Source : [http://www.magnet.fsu.edu/education/tutorials/tools/ionization\\_esi.html](http://www.magnet.fsu.edu/education/tutorials/tools/ionization_esi.html)

#### V.1.2.5 - Le spectromètre de masse de type Orbitrap (OT)

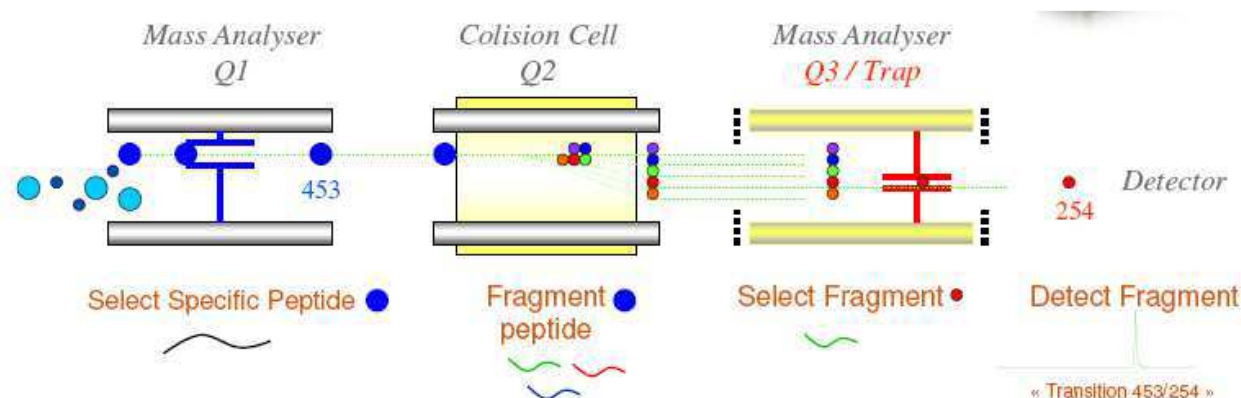
Depuis sa commercialisation en 2005, l'Orbitrap est devenu l'un des **instruments de choix** dans de nombreuses applications protéomiques. Sa haute **précision** de mesure de masse (2-5 ppm) et son pouvoir de **résolution** élevé (jusqu'à 150 000) le rendent très intéressant pour l'analyse de mélanges complexes. Ces nouveaux spectromètres de masse hybrides (Orbitrap XL, Vélos, Vélos Pro) dont les performances s'améliorent continuellement, permettent de superposer les modes d'analyse MS et MS/MS. Ils fournissent ainsi à la fois des informations quantitatives sur l'abondance des différents peptides mesurés avec une grande exactitude ainsi que des informations sur la séquence des peptides. Ces instruments répondent assez bien aux exigences d'analyses de plus en plus importantes en termes de sensibilité et permettent d'atteindre des protéines de faible abondance. En augmentant ainsi la profondeur d'analyse, ils génèrent des centaines, voire des milliers, de spectres de fragmentation par heure d'acquisition. L'attribution d'une séquence peptidique à ces spectres, la déduction des protéines représentées par les peptides identifiés et la détermination de leur abondance dans l'échantillon étudié sont autant de défis informatique et statistique à résoudre (Nesvizhskii, Vitek & Aebersold, 2007).



### V.1.2.6 - Le spectromètre de masse de type triple quadripôle (QqQ)

La création des spectromètres de masse de type **triple quadripôle** (QqQ) (Yost & Enke 1979), il y a 30 ans, a permis le développement d'analyses quantitatives des petites molécules (Korshunova *et al.*, 1999 ; Hoke *et al.*, 2001), notamment dans les applications cliniques (Roschinger *et al.*, 2003). Les analyses en mode **Multiple Reaction Monitoring (MRM)** ont émergé car elles permettent d'analyser de façon précise et quantitative des composants même peu abondants dans un échantillon complexe. La MRM n'est pas une technique nouvelle en soi, mais son application à la protéomique a émergé durant la dernière décennie (Gallien, Duriez, and Domon 2011).

La MRM est une **approche ciblée** sur des protéines candidates. Elle permet de sélectionner, d'observer et de quantifier les variations de peptides tryptiques, dits **protéotypiques**, d'une protéine d'intérêt dans différents échantillons biologiques. Ces peptides, de par l'unicité de leur séquence en acides aminés, sont spécifiques de la protéine étudiée. Ils vont permettre à la fois de caractériser, de représenter et de distinguer notre protéine candidate dans le mélange complexe de plusieurs milliers de protéines que contient l'échantillon (Picotti *et al.*, 2009). Lors de ce mode de fonctionnement particulier du triple quadripôle, les peptides représentant les protéines d'intérêt sont isolés. Les ions correspondant à la molécule d'intérêt, doublement ou triplement chargée, sont alors fragmentés. Certains des fragments spécifiques des ions parents sont sélectionnés puis détectés en vue de leur quantification (Figure 13). La sélectivité en MRM est donc très élevée.



**Figure 13 : Sélection des ions dans le spectromètre de masse de type QqQ en mode MRM.** L'ion parent en bleu est sélectionné en Q1 puis fragmenté en Q2. Le ou les ions fils sont sélectionnés en Q3. Au final, on détecte un binôme ion parent / ion fils autrement nommé transition.

Lorsque l'on choisit de suivre un unique ion fils fragment de l'ion parent, on parle alors de SRM pour Selected Reaction Monitoring. Des développements en MRM ont déjà été réalisés (*Schedule MRM*) et d'autres encore sont en cours (Lange *et al.*, 2008). Ils ont permis de

multiplexer les analytes et la mesure d'un plus grand nombre de peptides. Cela laisse augurer de nouvelles opportunités en termes de productivité et de possibilités expérimentales.

### V.1.3 - La quantification

La règle en quantification est d'évaluer le **taux d'expression des protéines**. La finalité étant d'acquérir une image de la dynamique du protéome en fonction d'un état de développement, d'un environnement ou encore d'un état physiologique ou pathologique. Le challenge ultime réside en la quantification absolue des protéines. Les capacités de **quantification relative ou absolue** reposent sur la nécessité d'un référent pour déterminer la stœchiométrie des protéines (Vaudel, Sickmann, and Martens 2010 ; Elliott *et al.*, 2009).

Traditionnellement, les protéines sont quantifiées sur des gels d'électrophorèse à deux dimensions (IEF-SDS PAGE ou 2-DE). Cette technique bidimensionnelle permet de visualiser un mélange de plusieurs centaines de protéines. Le principe est de séparer les protéines en fonction de leur point isoélectrique (pI) en 1<sup>ère</sup> dimension. Lors de cette focalisation isoélectrique (IEF), les protéines chargées se déplacent, sous l'action d'un champ électrique, le long du gradient de pH et s'immobilisent lorsqu'elles sont arrivées au pH correspondant à leur pI (charge nette nulle). Lors de la deuxième dimension, les protéines en conditions dénaturantes possèdent toutes la même charge, et sont alors séparées en fonction de leur masse moléculaire par une électrophorèse de type SDS-PAGE. Les protéines colorées au bleu de Coomassie, à l'argent ou avec des fluorophores sont visualisées sous forme de tâches ou spots. L'intensité colorante de chaque spot est proportionnelle à son abondance dans le gel. L'intégration de la densité optique de chaque spot est mesurée par un logiciel de densitométrie. Le pourcentage relatif d'un spot est calculé par le rapport de l'intensité de ce spot sur le cumul de l'intensité de tous les spots présents sur le gel.

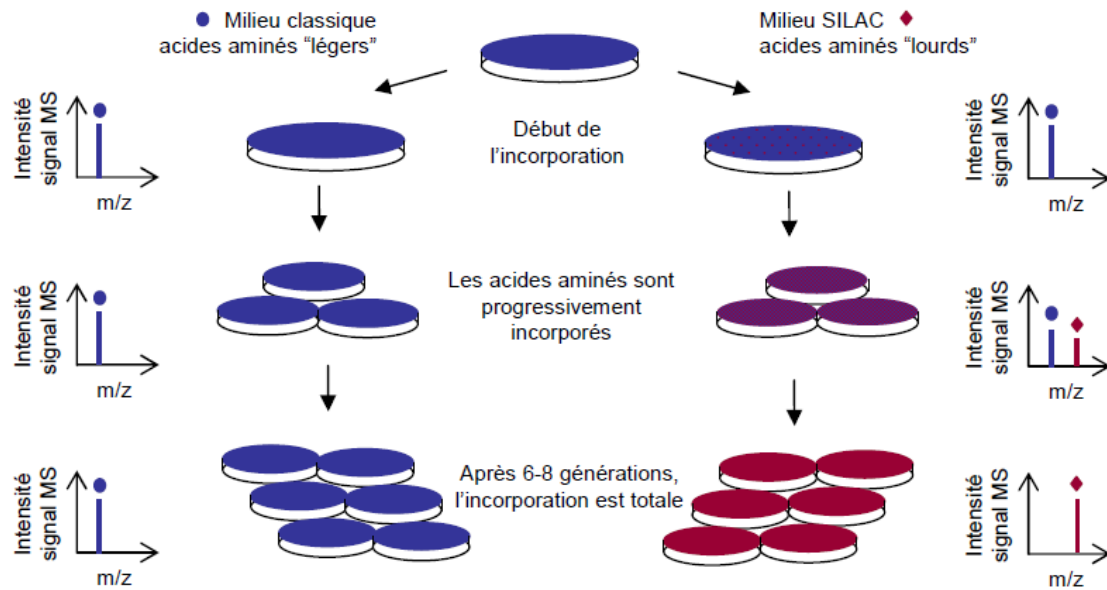
Le procédé le plus commun est de réaliser un **marquage chimique** (ICAT, iTRAQ) (Ross *et al.*, 2004) : les peptides des différents échantillons sont étiquetés et tracés. Dans le cas d'un **marquage métabolique** par des isotopes stables SILAC (Mann 2006 ; Cox *et al.*, 2009) ou N15 (Lanquar *et al.*, 2007 ; Gevaert *et al.*, 2008), deux échantillons (provenant de deux situations biologiques différentes) peuvent être mélangés dès le début du processus. Ils sont distingués par l'incrément de masse minime entre les deux isotopes chimiquement identiques. La quantification se fait par une comparaison des différences d'intensités de l'aire des pics des chromatogrammes d'ions (méthode différente pour ICAT). Ces 5 dernières années,

l'introduction de **standards externes** peptidiques : AQUA<sup>®</sup> (Gerber *et al.*, 2003), QconCAT<sup>®</sup> (Beynon *et al.*, 2005) ou protéiques : PSAQ<sup>®</sup> (Brun *et al.*, 2007 ; Brun *et al.*, 2009) permet désormais d'effectuer une quantification absolue.

Les approches **label-free** permettent, quand à elles, une quantification sans marquage (Clough *et al.*, 2009). La méthode AMT (*Accurate Mass Tag*) nécessite une haute précision de mesure des m/z des précurseurs et de reproductibilité de la séparation chromatographique afin d'aligner les temps de rétention des peptides que l'on souhaite quantifier (Ferro *et al.*, 2010). Enfin, la méthode la plus simple à mettre en place, rapide et à moindre coup afin d'identifier un enrichissement dans un échantillon, consiste en la **numération** par indice d'abondance : emPAI (Cox & Mann, 2008; Shinoda, Tomita, & Ishihama, 2010), NSAF (Griffin *et al.*, 2010) ou numération des spectres des ions parents (*Spectral Count* – SC ou SpC) (Malmström *et al.*, 2009).

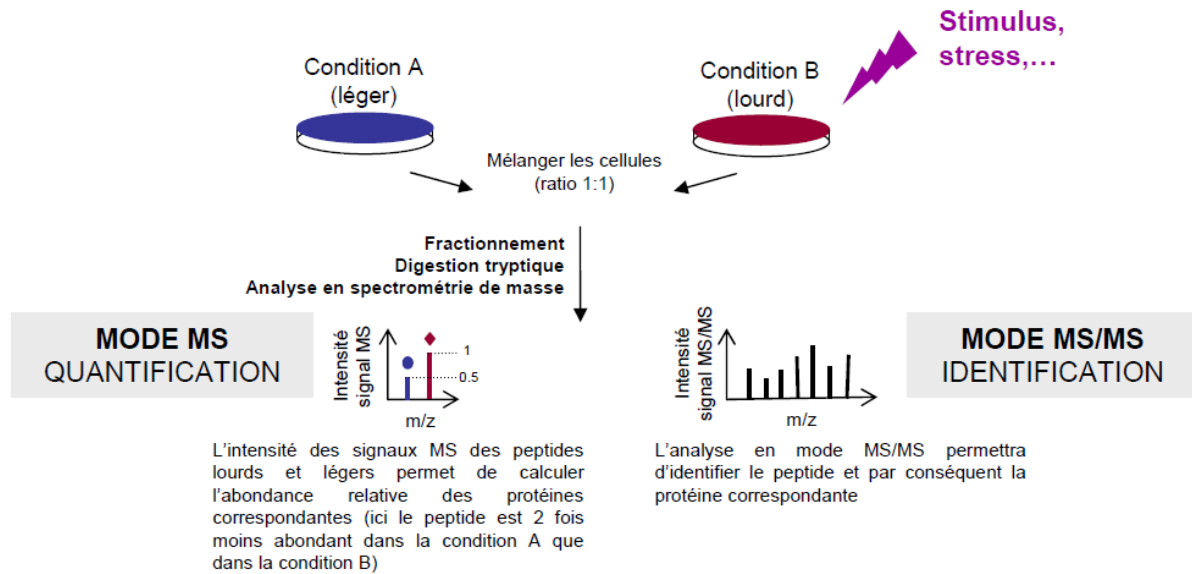
#### V.1.3.1 - La méthode SILAC (Stable Isotope Labeling with Amino Acid)

Les cellules sont cultivées (Figure 14) dans un milieu défini complété avec certains acides aminés essentiels, généralement de la lysine (K) et de l'arginine (R). L'une des deux cultures est réalisée avec les acides aminés « légers » (abondance naturelle des atomes de carbone <sup>12</sup>C et d'azote <sup>14</sup>N). L'autre culture est réalisée avec des acides aminés « lourds » (isotopes des atomes de carbone <sup>13</sup>C et d'azote <sup>15</sup>N). Après 6 à 8 générations de cellules en culture, l'incorporation en acides aminés marqués est complète. Les lysines et arginines marquées <sup>13</sup>C / <sup>15</sup>N (dans la majorité des cas) sont incorporées à la structure des protéines. La trypsine coupant les protéines après la lysine (K) et l'arginine (R), chaque peptide se retrouve marqué par un acide aminé « lourd ». On mesure alors une différence de masse de +8 Da avec K et de +10 Da avec R entre les peptides lourds et les légers.



**Figure 14 : Méthode de culture cellulaire SILAC en vue d'analyse comparative de deux échantillons protéiques :** A gauche en bleu sont représentées les cultures cellulaires en milieu classique avec des acides aminés « légers » et à droite sont représentées les cultures en milieu SILAC avec des acides « lourds » jusqu'à incorporation totale du marquage. Source : Emadali et Gallagher, 2009. Copyright version française Emadali

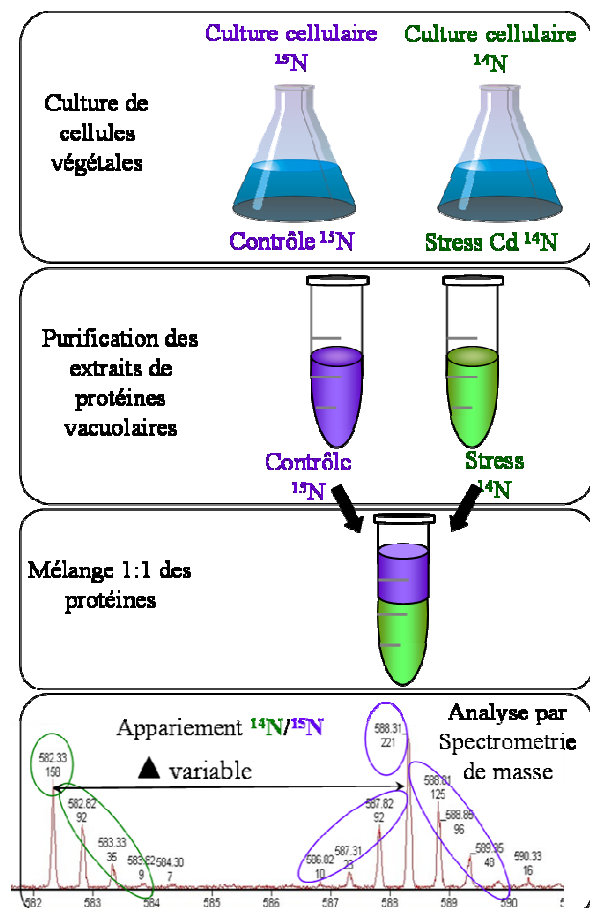
Dans les protocoles standards, les deux cultures 'légère' et 'lourde' sont mélangées avec un ratio de 1 pour 1. L'unique échantillon ainsi combiné contient alors les 2 populations de protéines que l'on souhaite comparer et va subir toutes les étapes du pipeline d'analyse. L'échantillon est fractionné, digéré à la trypsine puis analysé par spectrométrie de masse. La quantification est estimée à partir des analyses en mode MS par le calcul de l'abondance des paires de peptides lourds et légers (doublets). L'analyse en mode MS/MS permettra quand à elle une identification du peptide concerné et par conséquent de la protéine correspondante (Figure 15). Le stimulus ou le stress dont on souhaite mesurer l'effet est appliqué à l'une ou l'autre des deux cultures cellulaires et les deux expériences sont croisées et comparées. Les ratios d'abondance des doublets reflètent les changements relatifs d'abondance des protéines entre les deux conditions.



**Figure 15 : Méthode d'analyse de la technique SILAC** : A gauche en bleu est représentée la culture cellulaire en milieu classique avec des acides aminés « légers » et à droite est représenté la culture en milieu SILAC avec des acides « lourds ». Les deux cultures sont mélangées en proportion équivalente, formant ainsi un unique échantillon qui va subir toute les étapes du pipeline d'analyse. Source : Emadali et Gallagher, 2009. Copyright version française Emadali

#### V.1.3.2 - Le marquage métabolique à l'azote $^{15}\text{N}$

Afin d'observer l'évolution du protéome sans a priori, et ainsi de visualiser les protéines synthétisées de novo lors d'une situation physiologique changeante, une stratégie de protéomique quantitative, basée sur le marquage des protéines par un isotope d'azote  $^{15}\text{N}$ , est **idéale dans le cas des modèles végétaux** (Gruhler *et al.*, 2005 ; Gouw, Krijgsveld, and Heck 2010 ; Hebel *et al.*, 2008 ; Skirycz *et al.*, 2011 ; Huttlin *et al.*, 2007). La capacité d'**autotrophie** des végétaux leur permet de métaboliser des matières inorganiques en matières organiques. L'environnement des cellules en culture *in vitro* étant parfaitement contrôlé, les apports azotés (ammonium  $\text{NH}_4^+$  et nitrate  $\text{NO}_3^-$ ) sont fournis uniquement sous la forme d'isotope d'azote



« lourd » (N15). L'ammonium et le nitrate « lourds » sont assimilés par les cellules en culture et métabolisés par celles-ci. Le N15 va progressivement constituer la structure des protéines au cours des repiquages successifs des cellules. Toutes les protéines cellulaires sont alors marquées sur l'ensemble de leurs résidus azotés. On obtient ainsi une **population de cellules marquées N15**. La seconde population cellulaire est cultivée en milieu classique. Cette approche (illustrée par la Figure 16) permet de différencier deux populations cellulaires que l'on souhaite **comparer**. L'une ou l'autre de ces populations est soumise à un stress. Les extraits protéiques de ces deux cultures sont préparés, mélangés en proportions équivalentes, puis soumis à une digestion trypsique afin d'être analysés par spectrométrie de masse. L'isotope d'azote (N15) possède des propriétés physico-chimiques identiques à l'azote (N14), naturellement abondant. Les peptides tryptiques N14 et N15, obtenus à partir de la digestion du mélange de ces extraits protéiques, sont différenciés par l'incrément de masse dû à la présence d'azote 15. Il est alors possible d'identifier les protéines dont la néosynthèse se trouve induite lors du stress et de quantifier leurs proportions relatives entre les 2 échantillons.

#### V.1.3.3 - Label free

Lorsque l'on souhaite réaliser une quantification label free, il faut garder à l'esprit que cette quantification est relative et non absolue. Il peut s'agir d'une quantification « intra-échantillon » (c'est-à-dire une estimation de la quantité relative d'une protéine dans un même échantillon) ou d'une quantification « inter-échantillon » (soit une estimation du ratio de quantité d'une protéine donnée à travers plusieurs échantillons). Afin d'identifier un enrichissement dans un échantillon, la quantification label free peut être obtenue par un indice d'abondance (emPAI, NSAF) ou une numération des spectres des ions parents (*Spectral Count* – SC ou SpC) (Bindschedler & Cramer, 2011).

« **emPAI** » : L'emPAI est un indice d'abondance des protéines disponible dans Mascot<sup>®</sup>. À l'origine, le PAI (*Protein Abundance Index*) a été défini comme le nombre de peptides observés divisé par le nombre de peptides observables par protéine (Rappsilber *et al.*, 2002). Ishihama *et al.* réfèrent que les valeurs du PAI, obtenues pour différentes concentrations d'albumine dans le sérum, tracent une corrélation linéaire avec le logarithme des concentrations protéiques dans les analyses LC-MS2. Ils ont converti de manière exponentielle le PAI en emPAI (*Exponentially Modified Protein Abundance Index*) pour formaliser cette découverte (Shinoda, Tomita & Ishihama, 2010).

Soit l'équation suivante :  $\text{emPAI} = 10^{(N_{\text{observés}} / N_{\text{observables}})} - 1$

N observés = nombre de peptides observés expérimentalement

N observables = nb calculé de peptides observables pour chaque protéine (basé sur la masse de la protéine).

« **Spectral Count** » : Le spectral count (SpC ou SC) est une méthode de quantification relative définie comme le nombre de spectre de fragmentation total obtenu par peptide de chaque protéine (Malmström et al., 2009 ; Lee *et al.*, 2009).

#### V.1.3.4 - La quantification par MRM

La MRM (*Multiple reaction monitoring*) (Sherman *et al.*, 2009; Duncan *et al.*, 2009) est un mode d'analyse MS dans l'espace. Les deux événements de MS ont lieu dans des quadripôles différents (cf. annexe 1). Il s'agit d'une méthode ciblée puisque les données acquises sont enregistrées pour des ions précurseurs et des ions fragments choisis de façon spécifique et dont les valeurs de  $m/z$  sont connues.

##### a) *Sélection des peptides signatures*

Afin de mesurer uniquement l'abondance de la protéine d'intérêt, il est essentiel de sélectionner et de quantifier des peptides protéotypiques. Ces peptides sont définis ainsi de par l'unicité de leur séquence en acides aminés, ce qui signifie que cette séquence est spécifique telle une signature de la protéine. L'unicité des séquences est vérifiée par BLAST (*basic local alignment search tool*). Le BLAST est un algorithme utilisé en bio-informatique permettant de trouver les régions similaires entre deux ou plusieurs séquences de nucléotides ou d'acides aminés. Ce programme permet de calculer significativement les pourcentages de similitude entre les séquences en les comparant avec des banques de données. Dans notre cas, seuls les peptides avec peu ou pas de similitude sont conservés.

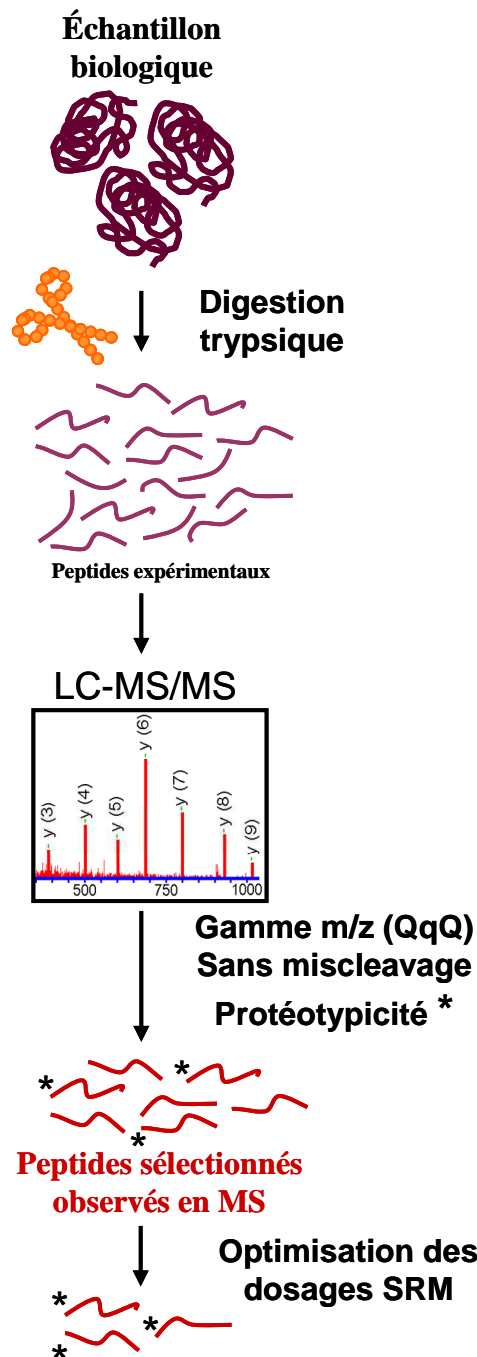
Mais avant de vérifier l'unicité de la séquence peptidique il faut tout d'abord sélectionner les peptides tryptiques (dans la majorité des cas, d'autres protéases pouvant être utilisées comme la chymotrypsine (T, Y, F) ou AspN (N)). Afin d'y parvenir deux méthodes sont possibles :

##### ☞ à partir de faits expérimentaux MS/MS

La sélection de peptides tryptiques pour le dosage SRM se fait dans l'idéal à partir de faits expérimentaux de MS/MS. Ces données expérimentales peuvent être issues de travaux de MS déjà effectués soit publiés dans la littérature, soit référencés dans des bases de données SRM. L'une des plus connue est Peptide Atlas (<http://www.peptideatlas.org/>) mais pour le moment les organismes végétaux n'y sont pas représentés. Toutefois il existe d'autres bases

telles que gpm (<http://gpmdb.thegpm.org/>) qui accepte les numéros d'accensions AGI (TAIR) comme format d'interrogation.

La solution idéale étant de réaliser une première analyse en mode MS/MS afin d'obtenir des spectres expérimentaux des protéines contenus dans notre échantillon (Figure 17) puis de réaliser un BLAST afin de ne conserver que les peptides protéotypiques.



**Figure 17 : Sélection des peptides signatures à partir de faits expérimentaux.** L'échantillon biologique contenant la ou les protéines d'intérêts suit le pipeline classique d'analyse MS. Les peptides inférieur à 6 aa et contenant des miscleavages ne sont pas retenue. Seuls les peptides protéotypiques de part l'unicité de leur séquence et dont la valeur de m / z est comprise entre 400 et 1200 (limite de détection du QTRAP 4000) sont conservées.



### Exemple At2g02040

- Prenons l'exemple d'une protéine vacuolaire PTR2 (*Peptide Transporter 2*) localisé au niveau du tonoplaste qui présente une grande affinité pour le transport d'oligopeptide.
- Après sélection des peptides analysés en mode MS/MS sur Orbitrap, 20 % des peptides de PTR2B sont observables (Figure 18).

PTR2\_ARATH Peptide transporter

```
MGSIEEEARPLIEEGLILQEVKLYAEDGSVDFNGNPPLKEKTGNWKACPFILGNECCERLAYYGIAGNLITYLTTKLH
QGNVSAATNVTTWQGTCTYLTPLIGAVLADAYWGRYWTIACFSGIYFIGMSALTLSASVPALKPAECIGDFCPSATPAQ
YAMFFGGLYLIALGTGGIKPCVSSFGADQFDDTDSRERVRKASFFNWFYFSINIGALVSSLLVWIQENRGWGLGFGI
PTVFMGLAIASFFFGTPLYRFQKPGGSPITRISQVVVASFRKSSVKVPEDATLLYETQDKNSAIAGSRKIEHTDDCQY
LDKAAVISEEESKSGDYSNSWRLCTVTQVEELKILIRMFPIWASGIIFSAVYAQMSTMFVQQGRAMNCKIGSFQLPPA
ALGTFDTASVIIWVPLYDRFIVPLARKFTGVDKGFTEIQRMGIGLFFSVLCMAAAAIIVEIIRLHMANDLGLVESGAPVPI
SVLWQIPQYFILGAAEVFYFIGQLEFFYDQSPDAMRSLCSALALLTNALGNYLSSLILTLVTYFTTRNGQEGWISDNLN
SGHLDYFFWLLAGLSLVNMAVYFFSAARYKQKKASS
```

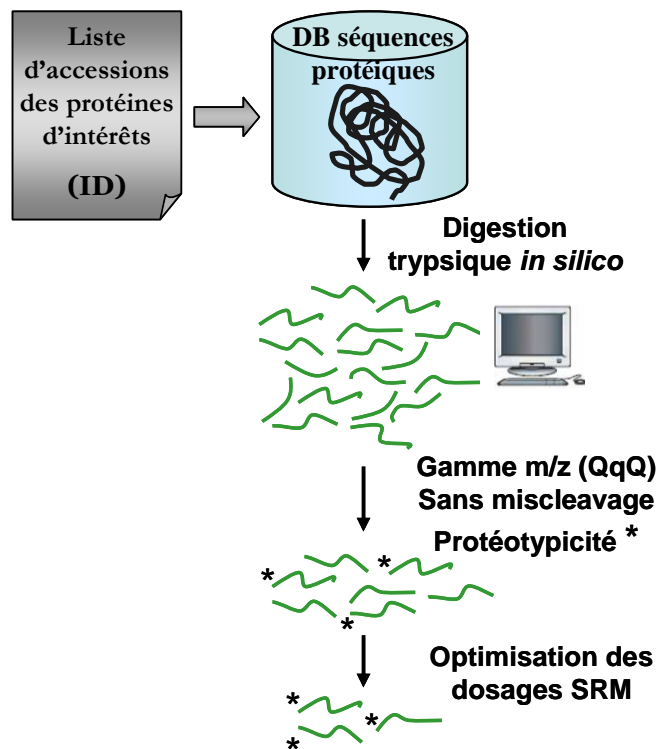
**Figure 18 : Peptides signatures après analyse expérimentale (en rouge)**

L'utilisation d'une source ESI favorise l'apparition d'ions multichargés  $2^+$  et  $3^+$ , seuls les peptides deux fois et trois fois chargés sont recherchés. Pour augmenter la spécificité de l'analyse SRM, la taille des peptides doit être supérieure à 6 aa et les miscleavages ne sont pas autorisés. Les peptides contenant des acides aminés tels que la méthionine et la cystéine sont éliminés à cause des modifications variables qu'ils peuvent subir de leur degré d'oxydation. Parmi les peptides tryptiques identifiés, tous ceux dont la valeur de  $m/z$  est comprise entre 400 et 1200 (limite de détection du QTRAP 4000) sont conservées afin de bâtir la méthode SRM.



*in silico*, par digestion et fragmentation théorique

Pour chacune des protéines que l'on souhaite doser par SRM, la séquence d'acides aminés (aa) est recherchée dans une base de données adaptée à l'organisme modèle, dans notre cas *Arabidopsis thaliana* (TAIR ou Uniprot). Les séquences FASTA sont exportées et chacune des séquences subit une digestion tryptique théorique soit à l'aide d'un outil EXPASY (<http://www.expasy.ch/proteomics>) ou dans notre cas mMass (un outil de MS open source cf. Matériel et Méthodes) (Figure 19). Les critères de sélection des peptides précédemment décrits sont appliqués.



**Figure 19 : Sélection des peptides signatures *in silico* par digestion théorique à l'aide d'outil informatique (data base et logiciel)**

*Exemple At2g02040*

- Reprenons l'exemple de la protéine PTR2 (*Peptide Transporter 2*) identifié au niveau du tonoplaste.
- Après digestion théorique, 62 % des peptides sont observables par le QqQ (Figure 20).

PTR2\_ARATH Peptide transporter

MGSIEEEARPLIEEGLILQEVKLYAEDGSVDFNGNPPLK<sup>\*</sup>EKTGNW<sup>\*</sup>KACPFI<sup>\*</sup>L<sup>\*</sup>GN<sup>\*</sup>EC<sup>\*</sup>CE<sup>\*</sup>RLAY<sup>\*</sup>YGIAGNLITYLT<sup>\*</sup>TKLH  
 QGNVSAATNVT<sup>\*</sup>TWQGTCYL<sup>\*</sup>TPLIGAVLADAYWGR<sup>\*</sup>YWTIACFSGIYFIGMSALTLSASVPALKPAECIGDFCPSATPAQ  
 YAMFFGGLYLIALGTGGIKPCVSSFGADQFDDTDSRERVRK<sup>\*</sup>ASFFNWFYFSINIGALVSSSL<sup>\*</sup>LVWIQEN<sup>\*</sup>RGWGLGFI  
 PTVFMGLAIASFFFGTPLYR<sup>\*</sup>FQKPGGSPITRISQVVVASFR<sup>\*</sup>KSSVK<sup>\*</sup>VPEDATLLYETQDK<sup>\*</sup>NSAIA<sup>\*</sup>GSRK<sup>\*</sup>IEHTDDCQY  
 LDKA<sup>\*</sup>AVISEEESKSGDYSNSWRLCTVTQVEELK<sup>\*</sup>LIR<sup>\*</sup>MFPIWASGII<sup>\*</sup>FSAVYAQMSTMFVQQGR<sup>\*</sup>AMNCK<sup>\*</sup>IGSFQLPPA  
 ALGTFDTASV<sup>\*</sup>IIVWPLYDRFIVPLARK<sup>\*</sup>FTGV<sup>\*</sup>DK<sup>\*</sup>GFTEIQRMGIGLFVSVLCMAAA<sup>\*</sup>AIVEIIR<sup>\*</sup>LHMANDLGLVESGAPVPI  
 SVLWQIPQYFILGAAEVFYFIGQLEFFYDQSPDAMR<sup>\*</sup>SLCSALALLTNALGNYLSS<sup>\*</sup>LILTLV<sup>\*</sup>TYFTTR<sup>\*</sup>NGQEGWISDNLN  
 SGHLDYFFWLLAGLSLVNMAVYFFSAARYKQKKASS

**Figure 20 : Peptides signatures après digestion et sélection théorique (en vert)**

Des modèles de prédiction de peptides protéotypique adapté au dosage SRM (Fusaro *et al.*, 2009) tels que l'algorithme ESP (*enhanced signature peptide*) predictor peuvent également être utilisés. ESP (cf Mat & Méth) fournit la liste des peptides trypsiques d'une protéine donnée et associe à chaque peptide un score compris entre 0 et 1. Ce score est représentatif du niveau de réponse faible ou élevé du peptide dans une expérience ESI-MS. Les peptides dont le score est supérieur à 0,4 sont sélectionnés pour la SRM.

- Après sélection des peptides dont le score ESP predictor est supérieur à 0,4 ; le pourcentage de peptides observables décroît à 18 % (Figure 21).

#### PTR2\_ARATH Peptide transporter

MGSIEEEARPLIEEGLILQEVK**LYAEDGSVDFNGNPPLK**EKTGNWKACPFILGNECCERLAYYGIAGNLITYLTTKLH  
 QGNVSAATNVTTWQGTCTLTPLIGAVLADAYWGRYWTIACFSGIYFIGMSALTLSASVPALKPAECIGDFCPSATPAQ  
 YAMFFGGGLYLIALGTGGIKPCVSSFGADQFDDTDSRERVRKASFFNWFYFSINIGALVSSSLVWIQENRGWGLGFGI  
 PTVFMGLAIASFFFGTPLYR**FQKPGGSPITRISQVVVASFR**KSSVK**VPEDATLLYETQDK**NSAIAGSRKIEHTDDCQY  
 LDK**AAVISEEESK**SGDYSNSWR**LCTVTQVEELK**LIRMFPIWASGIHSAVYAQMSTMFVQQGRAMNCKIGSFQLPPA  
 ALGTFDTASVIIWVPLYDR**FIVPLAR**KFTGVDK**GFTEIQR**MGIGLFVSVLCMAAAIVEIIRLHMANDLGLVESGAPVPI  
 SVLWQIPQYFILGAAEVFYFIGQLEFFYDQSPDAMRSLCSALALLTNALGNYLSSLILTLVTYFTTRNGQEGWISDNLN  
 SGHLDYFFWLLAGLSLVNMAVYFFSAARYKQKKASS

**Figure 21 : Peptides signatures après digestion théorique et prédiction ESP (en bleu)**

- En comparaison à la sélection ESP (score >0,4), la sélection expérimentale retient deux peptides supplémentaires LAYYGIAGNLITYLTTK (ESP score 0,1) et NSAIAGSR (ESP score 0)

#### b) Les méthodes de SRM

##### œ Construction d'une méthode SRM

Une fois les peptides prototypiques d'une protéine donnée sélectionnés, il faut bâtir la méthode de SRM. Dans le QqQ, le premier quadripôle va sélectionner l'ion parents, et le troisième va analyser les ions fragments. Le second quadripôle servira de cellule de collision. La méthode doit contenir toutes informations suivantes :

- ✓ La masse de l'ion précurseur (ions parent) qui est sélectionné en Q1
- ✓ Les masses des ions fragments (ions fils) qui sont sélectionnés en Q3
- ✓ La valeur de l'énergie de collision appliquée en Q2 pour fragmenter l'ion précurseur.
- ✓ La valeur du '*dwell time*' correspondant au temps durant lequel les ions fragments vont être scanné avant détection

La masse des ions précurseurs et fragments sont obtenus soit théoriquement, soit à partir de données expérimentales comme précédemment décrit.

Les valeurs de l'énergie de collision sont calculées pour chaque ion précurseur. La fragmentation est le résultat d'une augmentation d'énergie interne, l'ion parent va se dissocier et former des ions fils. L'énergie de collision (EC) est calculée selon la formule suivante :

$$EC = (\text{pente}) \times ((m/z) \text{ de l'ion précurseur}) + (\text{intersection})$$

Selon la charge des précurseurs ( $2^+$  ou  $3^+$ ) les valeurs de la pente et de l'intersection de la droite des RF appliquées diffèrent.

Les valeurs de '*dwell time*' habituellement utilisées varient entre 20 et 100 ms (millisecondes) (Lange *et al.*, 2008), dans notre cas le dwell time est fixé à 50 ms pour chaque transition (Figure 22).

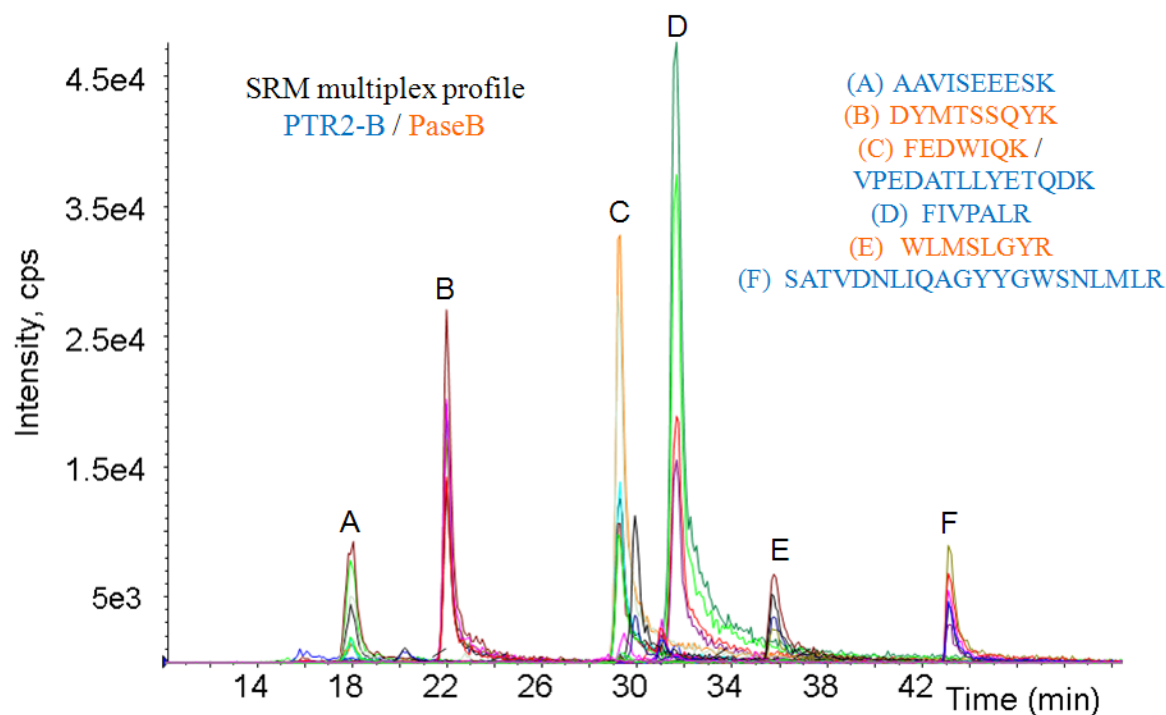
*Exemple At2g02040*

Q1	Q3	DT	pep sequence_ID prot	CE
531.79	621.27	50	AAVISEEESK_PTR 2	31.7
531.79	708.3	50	AAVISEEESK_PTR 2	31.7
531.79	821.39	50	AAVISEEESK_PTR 2	31.7
531.79	920.46	50	AAVISEEESK_PTR 2	31.7
537.25	627.26	50	AAVISEEESK_PTR 2	31.7
537.25	715.28	50	AAVISEEESK_PTR 2	31.7
537.25	829.37	50	AAVISEEESK_PTR 2	31.7
537.25	929.43	50	AAVISEEESK_PTR 2	31.7

**Figure 22 : Méthode SRM pour le peptide AAVISEEESK de la protéine PTR 2 :** la colonne Q1 correspond aux valeurs m/z des ions précurseurs du peptide donné sous sa forme  $^{15}\text{N}$  en jaune et sa forme  $^{14}\text{N}$  en vert, la colonne Q3 contient les valeurs de m/z des ions fragments, DT pour dwell time 50 ms, la 4<sup>ème</sup> colonne précise la séquence peptidique et le nom de la protéine, enfin CE pour énergie de collision calculé selon la formule précédemment décrite.

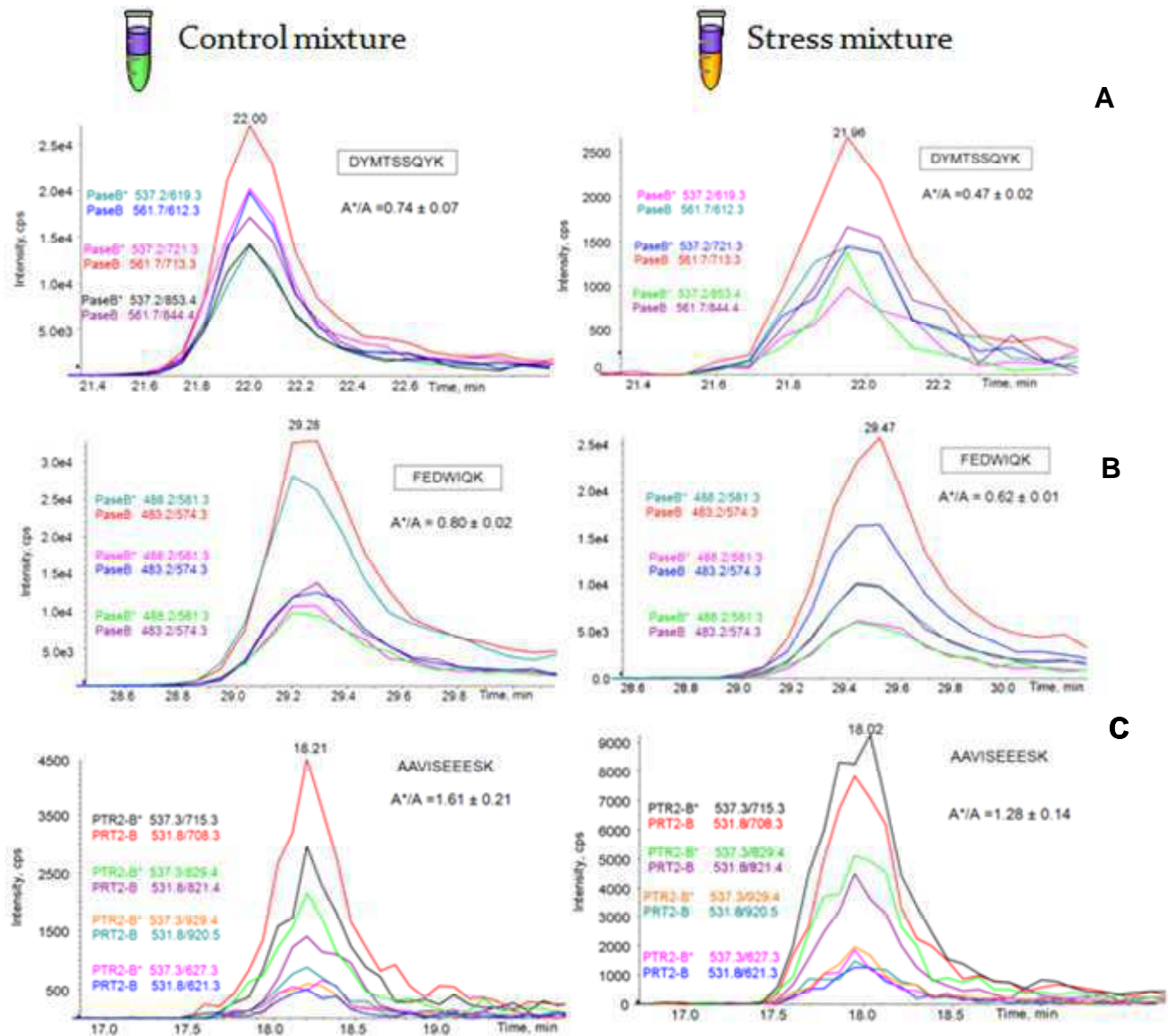
*c) Exemple de résultats SRM*

Le SRM étant une méthode spectrométrie de masse ciblée et sélective, le profil d'un chromatogramme de courant d'ions totaux SRM ne laisse apparaître que les transitions des peptides sélectionnés (Figure 23).



**Figure 23 : Visualisation d'un chromatogramme du courant d'ions totaux SRM présentant un profil d'analyse multiplexe.** Les transitions des différents peptides, en orange pour la phosphatase B (PaseB, At5g44020) et en bleu pour le transporteur de peptides (PTR2B, At2g02040) sont balisées par les lettres majuscules de A à F.

Les transitions de chaque peptide protéotypique sont mesurées et visualisées sous Analyste<sup>®</sup> (logiciel pilotage des QTRAP ABSciex). L'aire des pics de chaque transition est intégré et les ratios sont calculés pour les peptides  $^{14}\text{N}$  et  $^{15}\text{N}$  dans chacun des échantillons, le contrôle ( $^{14}\text{N}$  témoin /  $^{15}\text{N}$  standard) et le mélange stress cadmium ( $^{14}\text{N}$  stress cadmium /  $^{15}\text{N}$  standard). La Figure 24 présente des exemples de transitions SRM mesurées pour deux protéines (At2g02040 et At5g44020). Les transitions A et B correspondent aux peptides protéotypiques DYMTSSQYK et FEDWIQK de la protéine PaseB At5g44020. Les transitions C et D correspondent aux peptides protéotypiques VPEDATLLYETQDK et AAVISEEESK de la protéine PTR2B At2g0240. Pour chaque transition on observe un doublement du signal dû à la présence des peptides sous leur forme  $^{14}\text{N}$  et  $^{15}\text{N}$ .



**Figure 24 : Exemple de transitions SRM de 2 peptides protéotypiques des protéines PTR2B At2g02040 et PaseB At5g44020.** Les transitions A et B correspondent aux peptides protéotypiques DYMTSSQYK et FEDWIQK de la protéine PaseB At5g44020. Les transitions C correspondent aux peptides protéotypiques VPEDATLLYETQDK de la protéine PTR2B At2g02040. La colonne de gauche correspond à l'échantillon contrôle (14N témoin / 15N standard) et le mélange stress cadmium (14N stress cadmium / 15N standard).

#### V.1.4 - La protéomique fonctionnelle et interactome.

Comprendre le fonctionnement d'une cellule suppose de déchiffrer les mécanismes moléculaires complexes qui régissent les différentes activités cellulaires. L'ensemble des gènes ou génome, d'un organisme, constitue une banque de données statique et caractéristique de cet organisme. À partir d'un génome unique, chaque type cellulaire d'un organisme va exprimer un

ensemble de protéines, ou protéome, qui va varier en fonction de l'environnement de la cellule. Comme les **protéines** constituent les **acteurs finaux des processus biologiques**, leur étude est susceptible d'offrir la vision la plus pertinente du fonctionnement d'une cellule. Cet avantage est considérable lorsqu'on est capable de déterminer dans un mélange les quantités absolues ou relatives des protéines. À travers l'analyse des ARN, les expériences de puces à ADN sont capables de fournir le niveau d'expression des gènes. Si l'on transpose ce concept de transcriptomique à la protéomique quantitative et fonctionnelle, on peut alors définir un concept d'expression des produits finaux des gènes. De plus, contrairement à la transcriptomique, la protéomique permet de localiser et de déterminer les niveaux de production subcellulaire.

Au-delà de la quantification et de l'identification d'une liste de protéines, afin de qualifier au mieux les fonctions biologiques, il est indispensable de caractériser les interactions avec d'autres protéines, de l'ADN, de l'ARN ou encore d'autres substances. Cette exploration des **interactions protéiques** est sans doute la partie la plus ardue de l'exploitation des données mais aussi la plus utile pour associer une protéine à une fonction ou un processus. Dans l'ère de la post-génomique, l'établissement de réseaux d'interactions à l'échelle cellulaire devrait révéler de nombreux aspects de l'organisation cellulaire et de son fonctionnement.

La détermination des interactions protéines-protéines peut se faire à base de protéomique, notamment par l'utilisation **AP-MS** (*affinity purification mass spectrometry*) (Aiken, Kaake, X. Wang, & L. Huang, 2011; Bousquet-Dubouch et al., 2009; Kaake, X. Wang, & L. Huang, 2010). Le principe étant d'utiliser une protéine d'intérêt comme **appât** et d'identifier les protéines qui interagissent avec, par MS. Toutefois, ce qui peut paraître simple dans son principe est souvent plus difficile dans la pratique. En effet, la préservation de l'environnement cellulaire et des interactions nécessite une solubilisation des protéines et une lyse cellulaire ménagée. En outre, la haute sensibilité de la MS peut facilement conduire à l'identification de centaines de protéines en arrière-plan. Cette donnée doit être prise en compte dans l'équation et nécessite la quantification des protéines pull-down de l'appât par rapport à un témoin. Lorsque cela est le cas, l'AP-MS peut fournir des informations très fiables sur les **interactions entre protéines**. Les interactions spécifiques des protéines avec l'ARN et l'ADN ainsi qu'avec d'autres biomolécules peuvent être déterminées avec des méthodes très similaires.

L'utilisation de la technique des **gels natifs** (BN-PAGE) couplée à la MS peut donner le même type d'information (Pflieger, Bigeard, & Hirt, 2011). Le format expérimental est différent puisque cette fois, nous tentons de déterminer « tous » les **partenaires protéiques des complexes** au sein d'un échantillon d'intérêt et que les quantités ne sont pas mesurables. Mais

cette électrophorèse bidimensionnelle permet de séparer les complexes protéiques d'un échantillon en préservant les associations de protéines qui les composent lors de la première dimension puis de les dissocier dans la seconde dimension, en conservant l'information de filiation. Après l'identification en MS, il est alors possible de prédire des associations et interactions protéines-protéines (Babusiak, Man, Petrak, & Vyoral, 2007; Darie, Biniossek, Winter, Mutschler, & Haehnel, 2005; Krause, 2006; Reisinger & Eichacker, 2008).

## **V.2 - La protéomique subcellulaire des plantes**

La connaissance de la localisation subcellulaire des protéines permet de mieux **comprendre la fonction des organites** et la compartimentation du métabolisme des plantes. Mais la description précise du protéome d'un organite nécessite d'identifier clairement les véritables protéines résidantes du compartiment étudié. Il est nécessaire de mettre en place un protocole d'isolement de l'organite d'intérêt et de contrôler l'homogénéité et la **pureté de la préparation**. De plus, l'analyse des protéines très faiblement abondantes des séries de données protéomiques est limitée, même pour les appareils de haut débit actuel. Deux revues de protéomique sur les plantes (Lilley and Dupree 2007; Agrawal *et al.*, 2010 et leurs références) résument les efforts menés dans l'exploration de la composition des organelles végétaux par des techniques de protéomique. Même si plusieurs approches ont été testées et utilisées avec succès pour l'analyse protéomique des organites tels que les chloroplastes (Peltier *et al.*, 2000, Rolland *et al.*, 2003, van Wijk *et al.*, 2004 ; Peltier *et al.*, 2004 et Ferro *et al.*, 2010), les peroxysomes (Eubel *et al.*, 2008 ; Fukao, Hayashi, and Nishimura 2002 ; Reumann 2011 ; Palma, Corpas, and del Río 2009), les mitochondries (Bardel *et al.*, 2002 ; Heazewood *et al.*, 2003 ; Millar *et al.*, 2005) et les noyaux (Bae *et al.*, 2003 ; Calokowski, Meulia & Meier, 2003 ; Jones *et al.*, 2009), l'analyse des autres organites est difficile en raison de la **complexité** de leur purification et des ambiguïtés d'identifications qu'il peut découler d'une biogenèse commune. Cela est particulièrement vrai pour les **organites de la voie sécrétoire des plantes** (Agrawal, *et al.*, 2010 b).

### **V.2.1 - Fractionnement cellulaire**

Afin d'étudier le protéome d'un organite, il est indispensable de **l'isoler et de le purifier**. Les méthodes de fractionnement cellulaire utilisent classiquement un gradient de densité et la centrifugation pour y parvenir. Ces étapes en amont vont permettre une simplification de l'échantillon et potentiellement un gain de connaissance du protéome : les



protéines minoritaires pourront être révélées. La préparation des échantillons est probablement l'étape la plus critique en protéomique des organites : la qualité de l'échantillon biologique analysé est souvent le facteur limitant (Pflieger & Rossier 2008 ; Agrawal *et al.*, 2010).

Suivant le matériel de départ, tissu végétal ou cellules, et le type d'organite que l'on souhaite purifier, la méthode pour obtenir le lysat cellulaire sera plus au moins douce. Les **cellules végétales** sont entourées d'une **paroi rigide**, essentiellement composée de pectine et de cellulose qui leur confèrent une grande résistance. Les forces de pression, qu'il serait nécessaire d'utiliser pour rompre ces parois, seraient de loin supérieures à ce que peuvent supporter certains organites, comme les vacuoles par exemple ; ce qui n'est pas le cas des noyaux ou des chloroplastes. Pour obtenir une lyse cellulaire ménagée et libérer les constituants intracellulaires 'les plus fragiles' intacts, il est indispensable de produire au préalable des **protoplastes**. La digestion de la paroi pecto-cellulosique, dans une solution enzymatique constituée d'un mélange de pectolyase et de cellulase, permet, après incubation, d'obtenir des protoplastes. Une fois les protoplastes lysés, l'osmoticum, le pouvoir tampon, le pH, la force ionique, la présence d'agent réducteur, doivent être optimisés car des perturbations du milieu peuvent être préjudiciables à l'intégrité physiologique des organites et leur composition. Une fois le lysat homogène obtenu, le réel fractionnement commence (Pflieger & Rossier 2008).

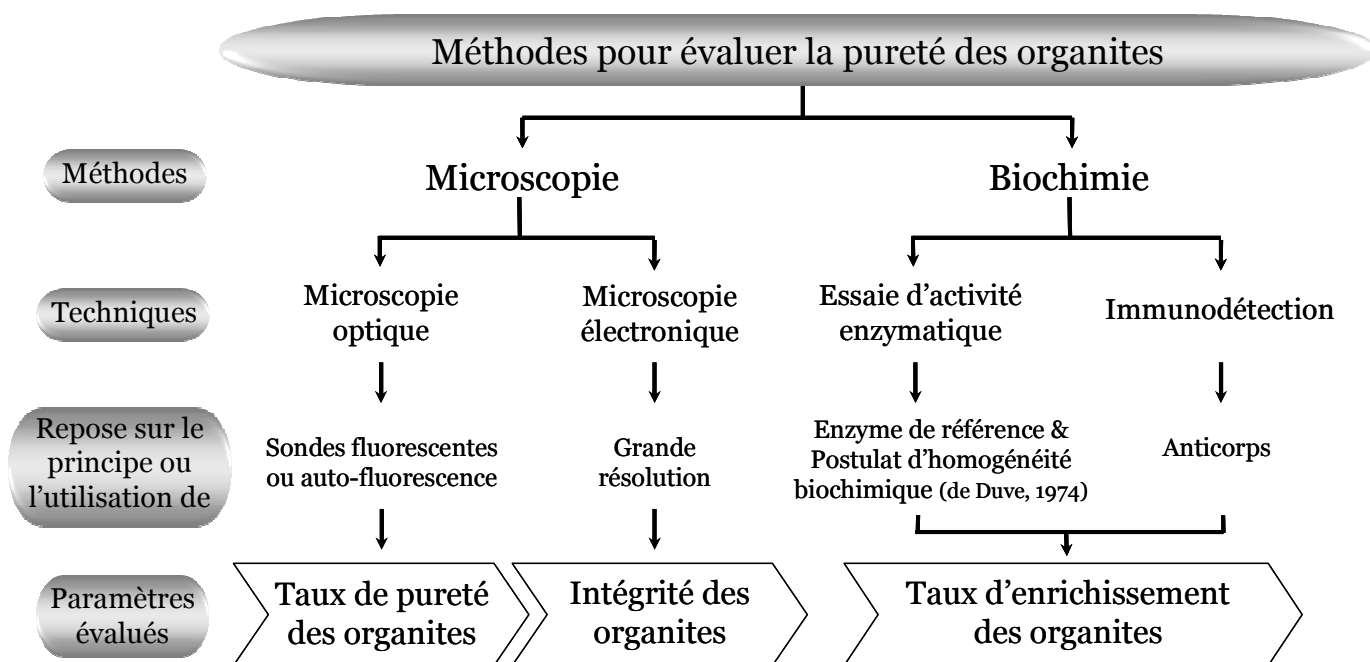
Le fractionnement, pour être efficace, se base sur les différences physiques entre les organites. Une première étape implique souvent une **filtration** de l'homogénat à travers un tamis dont la taille des pores doit être adaptée à l'organite à isoler. Les cellules encore entières et les débris sont majoritairement éliminés lors de cette première étape. Une série de centrifugations différentielles sera ensuite utilisée pour éliminer sélectivement les autres compartiments et contaminants et enrichir le milieu en l'organite cible. La vitesse de **centrifugation** dépend de la taille et la densité des organites à isoler. Les organites les plus grands et les plus denses sont culottés à moindres forces centrifuges. L'utilisation de gradient de densité (de Percoll majoritairement) permet d'affiner le fractionnement et d'enrichir l'organite cible au niveau d'une zone de densité précise (Agrawal *et al.*, 2010 a).

### V.2.2 - Contrôle qualité et pureté

La mise en place d'une préparation d'organites purs et homogènes est une tâche précise et complexe. Elle nécessite une évaluation de la **qualité**, des **rendements** de préparation et du degré d'**enrichissement** pour limiter les contaminations. Or, aucun protocole d'isolement

d'organites ne permet de s'exempter totalement des contaminations. Le succès de l'analyse protéomique dépend de la sensibilité avec laquelle on peut détecter à la fois les protéines cibles et les contaminations. Le niveau de confiance est alors largement corrélé au degré de purification et aux mesures dans lesquelles les contaminations peuvent être reconnues et réduites ou évitées (Agrawal *et al.*, 2010 a).

Il existe différentes méthodes qui contribuent à l'évaluation des degrés de pureté : des méthodes de **microscopie** (souvent plus direct) et de **biochimie** (Figure 25).



**Figure 25 : Vue schématique des méthodes de microscopie et de biochimie utilisées pour évaluer la pureté des organites.**

D'après Agrawal *et al.*, 2010. Source : Mass Spectrometry reviews DOI 10.1002

### V.2.3 - Les données sur la vacuole

Un aperçu des fonctions de la vacuole peut être défini à travers son "**vacuome**" (protéome vacuolaire). Plusieurs groupes, dont le nôtre, se sont attelés à cette tâche : environ 1100 protéines différentes ont été identifiées à partir de culture de cellules d'*Arabidopsis* en suspension (Shimaoka *et al.*, 2004; Jaquinod *et al.*, 2007), de feuilles d'*Arabidopsis* (Carter *et al.*, 2004), d'orge (Endler *et al.*, 2006, 2009) et d'inflorescences de chou-fleur (Schmidt *et al.*, 2007). En utilisant **différentes procédures d'extraction** biochimique telles que de l'hydroxyde de sodium, l'acétone, le chloroforme / méthanol, l'analyse des données contre la base de données d'*Arabidopsis* a permis à Schmidt *et al.* (2007) d'identifier 102 protéines vacuolaires intégrales et 214 protéines périphériques chez le chou-fleur. Cette étude a également montré que

la pyrophosphatase vacuolaire était la protéine la plus abondante de leur modèle. **Shimaoka et al.** (2004) ont majoritairement identifié des protéines solubles de la fraction vacuolaire. Seules quarante-deux des 163 protéines ont été annotées avec un ou plusieurs domaine(s) transmembranaire(s) (>1 TMDs) dont 17 protéines recensées comme des transporteurs putatifs. Les travaux de **Szponarski et al.** (2004) ont permis la caractérisation de 80 protéines à partir d'une fraction enrichie en tonoplaste d'*Arabidopsis*, avec seulement un petit nombre de transporteurs. Pour finir, les travaux de **Carter** (2004) ont permis, quant à eux, d'identifier un grand nombre de protéines (402 protéines), mais presque la moitié des protéines listées ont été identifiées par un peptide unique ; ce qui est souvent insuffisant pour être confiant et garantir l'identification de ces protéines. Ils référencent 29 protéines en tant que transporteurs et 17 protéines membres du complexe de l'H<sup>+</sup>ATPase.

Compte tenu de la large gamme dynamique d'abondance des protéines et de l'extraordinaire complexité d'un protéome, l'enrichissement des protéines de faible abondance est l'une des clés pour parvenir à une analyse la plus exhaustive possible. Dans ce but, une des premières stratégies développées par notre équipe (**Jaquinod et al.** 2007) fut d'élaborer une méthode de préparation de l'échantillon vacuolaire nommée "Diviser pour Conquérir". Ce protocole a permis l'identification de **416 protéines** qui co-purifient avec la fraction **membranaire** hydrophobe. Seulement 20% des protéines identifiées étaient déjà connues pour être associées aux activités vacuolaires. Dans cette étude, plusieurs **localisations subcellulaires** vacuolaires ont été confirmées par des transfections transitoires *in planta* de plants de tabac et de protoplastes d'*Arabidopsis*. Ces constructions chimères (système Gateway), contenant un rapporteur fluorescent (GFP- *Green Fluorescent Protein*) ont été réalisées pour un transporteur de sucre (At1g19450), deux protéines Band 7 (At1g69840 et At5g62740), une enzyme de la voie de biosynthèse des brassinostéroïdes : la protéine DWARF (At3g19820), une lipocaline (At5g58070), le transporteur NRAMP3 (At2g23150) et une dioxygénase du catabolisme des caroténoïdes NCED1 (At3g63520).

De récents travaux (Whiteman *et al.*, 2008) sur des vacuoles, préparées à partir de feuilles d'*Arabidopsis*, combinés à une purification des membranes sous forme de microsomes, ont identifié **66 sites de phosphorylation sur 58 protéines tonoplastiques**. Parmi les sites de phosphorylation, 31 ont été déterminés comme appartenant à 28 transporteurs membranaires de diverses familles (CTC, KUP, ABC, MFS). Cette étude illustre bien la difficulté à obtenir des membranes tonoplastiques pures, non imprégnées de la présence de protéines provenant de la membrane plasmique, comme l'ATPase de type P (Whiteman *et al.*, 2008). Afin de contourner

ces difficultés, Lilley et ses collaborateurs ont conçu une élégante méthode appelée **LOPIT** (*Localization of organelle proteins by isotope tagging - iTRAQ*) (**Dunkley et al.**, 2004, 2006). Ils avaient pour objectif d'identifier la localisation subcellulaire de plusieurs protéines membranaires après séparation de fractions microsomales par ultra-centrifugation, et ne réalisaient donc pas une étude spécifiquement tonoplastique. Les microsomes, séparés sur gradient d'iodixanol, ont été récoltés en plusieurs fractions correspondant à des densités différentes. Les protéines de chaque fraction ont alors été digérées à la trypsine et les peptides résultants marqués avec l'**iTRAQ**, un réactif présent sous 4 formes (114, 115, 116, 117) isobariques (donc identiques en mode MS), mais différenciables en mode MS/MS. Les fractions, chacune marquée avec une forme différente d'iTRAQ, ont ensuite été rassemblées pour en identifier le contenu en une seule analyse. Il a alors été possible, pour chaque protéine identifiée, d'en connaître la répartition à travers les fractions. Une analyse statistique en composantes principales a permis de générer des **clusters** de protéines, au sein desquels certaines, dont la localisation sub-cellulaire était bien connue, ont permis d'affecter une localisation à l'ensemble du cluster (Sadowski *et al.*, 2006). Ils ont identifié 689 protéines et appliqué leur méthode pour attribuer les protéines aux organites. Ainsi 527 protéines identifiées ont été affectées à l'ER, l'appareil de Golgi, le plasmalemme, le tonoplaste, la mitochondrie et les plastides. À titre d'exemple, l'étude LOPIT indique que plusieurs membres de la famille de **transporteurs MRP** (MRP1, MRP8, MRP10 et MRP14, *multidrug resistance proteins*) sont localisés au niveau du tonoplaste. Cette famille de protéines a également été observée dans d'autres études protéomiques vacuolaires. Leur localisation au tonoplaste apparaît donc sans ambiguïté.

#### V.2.4 - Conclusion sur la protéomique subcellulaire des plantes

La priorité actuelle en protéomique des organites est d'identifier et de caractériser le plus **exhaustivement** possible les protéines des différents compartiments cellulaires, tout en veillant à ce que les attributions de protéines **spécifiques** de chaque organite présentent un indice de confiance suffisant. Les chercheurs pourront ainsi mieux comprendre les fonctions connues d'un organite ou en révéler de nouvelles.

### V.2.5 - Stress cadmium et protéomique

Dans la revue (Villiers *et al.*, 2011, en annexe 3), nous avons fait une synthèse des **analyses protéomiques et métabolomiques** réalisées sur la réponse des plantes au stress engendré par le **cadmium** (cf. tableau 1, Villiers *et al.*, 2011). Ces outils « omiques » fournissent des informations sur les modifications moléculaires ayant cours lors d'un stress Cd. Grâce à l'analyse quantitative des protéines et des métabolites, l'établissement d'une série de mécanismes systémique ou cellulaire, plus ou moins spécifiques, conduisant à limiter puis à neutraliser le Cd, a été établie (cf. figure 1 Villiers *et al.*, 2011).

L'analyse détaillée, des mécanismes de réponse au stress Cd, révèle que la majorité des adaptations mises en place par la plante ne sont pas particulière à la contrainte cadmium mais dues à un **syndrome d'adaptation générale au stress** ('*general adaptation syndrome*' défini par Hans Selye) (Liu *et al.*, 2009 ; Petrak *et al.*, 2008 and Wang, Bouwman, & Mariman, 2009). Au niveau cellulaire, cela se traduit par une induction, des protéines classiques de réponses aux stress tels que les enzymes de la glycolyse, les HSP ou GST. Les protéines identifiées sont probablement les plus abondantes (la partie émergée de l'iceberg) et **l'ensemble de protéines plus spécifiques reste alors caché**. Pour gagner en exhaustivité, des approches de protéomique, label-free ou avec marquage, peuvent être envisagées. Des stratégies alliant les données issues de la transcriptomique et de la protéomique pourraient permettre d'analyser pleinement la réponse au Cd. De manière générale, la combinaison d'approches « omiques » permettra certainement de décrypter au mieux ces mécanismes et ainsi d'obtenir un aperçu de la spécificité de réponse organite-cellule à un stress particulier.

### V.3 - La fouille des données

L'interprétation des données de protéomique et « omique » en règle générale nécessite un ordonnancement des données poussé soit :

- par une hypothèse que l'on a souhaité tester expérimentalement, par exemple : la comparaison de deux situations biologiques
- par la preuve de concepts fonctionnels comme la spécificité d'un compartiment cellulaire.

La première étape, afin de parvenir à une conclusion biologique justifiée, est de **regrouper et de visualiser les données** par des moyens informatiques. Les données que l'on souhaite traiter sont donc majoritairement regroupées dans des fichiers de type tableurs ou base de données. La seconde étape consiste en **l'ajout d'informations** pour chaque élément identifié, à partir des différentes bases de données en accès libre sur le web. On peut distinguer

deux niveaux d'informations : celles qui renseignent sur la constitution même de la protéine (séquence, nature physico-chimique, structure) et celles qui indiquent sa fonction, son rôle et ses interactants potentiels (Fukushima *et al.*, 2009).

## ***VI - Les objectifs de la thèse***

La synthèse bibliographique permet de mettre en lumière le contexte de ce travail de thèse. Afin de caractériser les acteurs protéiques vacuolaires impliqués dans la détoxification du cadmium chez les plantes, **une caractérisation approfondie du protéome de la vacuole en condition non stressante est un préalable indispensable pour mieux comprendre les fonctions de la vacuole**. Au cours de ma thèse, nous avons donc choisi d'entreprendre différentes expériences afin d'y parvenir. Une nouvelle étude du protéome, avec une purification plus poussée, a été entreprise sur des instruments d'analyse plus performants. L'étude du protéome vacuolaire génère un grand nombre de données d'identification de protéines dans les différentes fractions étudiées. Afin d'optimiser la gestion et l'interrogation de ces données, **une base de données At\_Vacuole** a été constituée. Cette base a été mise à jour et complétée au fur et à mesure des acquisitions réalisées au cours de ce travail.

L'étude de la localisation subcellulaire et la connaissance de la fonction des protéines permettent de mieux appréhender la fonction des organelles et la compartimentation du métabolisme des plantes. Or, aucun protocole d'isolement d'organites ne permet de s'exempter totalement des contaminations (Agrawal *et al.*, 2010 a). La vacuole appartient à la voie cellulaire lytique, elle y joue un rôle essentiel dans la gestion des déchets cellulaires et la dégradation des organites altérés. Des phénomènes d'endocytoses entraînent l'internalisation de composés « polluants » pour l'analyse de la **spécificité du contenu vacuolaire**. Afin de discriminer les protéines spécifiques de la vacuole des éventuels contaminants, j'ai développé une stratégie de **'shave and conquer'**. Cette stratégie complète les connaissances d'études préalables que nous avons, grâce aux comparaisons des cartographies par gel en deux dimensions de la fraction soluble vacuolaire et cytoplasmique. Ces expériences de 'shave and conquer' nous permettent de différencier et de localiser de façon précise les protéines qui sont associées au tonoplaste, contenues ou contaminantes de la vacuole.

Pour aller au-delà de la simple liste de protéines et afin de caractériser les interactions possibles entre les protéines présentes dans la vacuole, nous avons entrepris d'étudier **l'organisation supramoléculaire des protéines vacuolaires** grâce à la technique des « Blue

Native Gels » (BN-PAGE) (Rexroth *et al.*, 2003; Reisinger and Eichacker 2008). Les BN-PAGE ont été beaucoup et sont encore largement utilisés pour décrire les complexes protéiques mitochondriaux et chloroplastiques très abondants. Mais ils n'ont jamais été appliqués pour décrire les protéines tonoplastiques et solubles vacuolaires (Krause, 2006).

Le premier chapitre, sous forme d'article, présente l'identification et l'organisation des protéines du suc vacuolaire. Ce chapitre décrit la spécificité des **protéines vacuolaires solubles** en comparaison aux protéines cytosoliques à travers différentes expériences. Le second chapitre dévoile le panel de protéines identifiées dans la fraction associée à la membrane et **membranaire** par l'utilisation des méthodes décrites ci-dessus. Le troisième chapitre détaille la mise en place des outils et des méthodes d'analyse destinés à suivre l'évolution qualitative et quantitative du **protéome lors d'un stress** causé par un ion métallique.

Pour étudier l'évolution et le comportement des protéines vacuolaires chez *Arabidopsis thaliana* lors d'un stress cadmium, deux approches ont été envisagées. La **dynamique du protéome vacuolaire** a été observée, **sans a priori**, pour visualiser les protéines synthétisées *de novo* par une stratégie de protéomique quantitative basée sur le **marquage** des protéines par un isotope stable. Cette approche permet de différencier deux populations cellulaires que l'on souhaite comparer (Lanquar *et al.*, 2007; Snijders, Vos, and Wright 2005). Parallèlement à l'étude *sans a priori*, j'ai développé une approche innovante, **ciblée** sur des protéines potentiellement impliquées dans la réponse au stress cadmium par Selected Reaction Monitoring (**SRM**) (Wolf-Yadlin *et al.*, 2007). Les protéines candidates sont issues de la comparaison croisée entre des données quantitatives de transcriptomique de stress Cd, obtenues au laboratoire PCV (Herbette *et al.*, 2006) et des données de protéomique vacuolaire. Le croisement et l'intégration des différents niveaux d'information acquis sur la vacuole, que sont les données de protéomiques, transcriptomiques et physiologiques doivent permettre d'accroître les connaissances fonctionnelles du système biologique qu'est la vacuole.





# Matériels et Méthodes

<b>MATERIELS ET METHODES.....</b>	<b>88</b>
<b>I - PREPARATION DES ECHANTILLONS BIOLOGIQUES.....</b>	<b>88</b>
<b>II - CARACTERISATION BIOCHIMIQUE DES ECHANTILLONS .....</b>	<b>98</b>
<b>III - ANALYSES PROTEOMIQUES.....</b>	<b>105</b>

## **I - Préparation des échantillons biologiques**

### **I.1 - Matériel Végétal et conditions de croissance**

#### ***I.1.1 - Culture in vitro de suspensions de cellules d'Arabidopsis thaliana***

Le matériel végétal utilisé pour cette étude est issu de cellules de méristèmes foliaires d'*Arabidopsis thaliana* var. Columbia (Axelos et al., 1993). Ces cellules (Figure 26), photosynthétiques, sont maintenues dans 200 mL d'un milieu de culture Murashig & Skoog (poudre basal medium 0,44 % [p/v] (Sigma, ref. M5519) ; saccharose 88 mM ; acide 2,4-dichlorophenoxyacetic 0,02 g.L<sup>-1</sup> ; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,3M ; Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 30 mM, pH 5,5). Elles sont repiquées tous les 7 jours à raison de 5 mL de cellules (sédimentées par centrifugation à 115 g, 5 min) dans 100 mL de milieu neuf (soit un repiquage à 5% PCV : Packed Cell Volume). Dans des erlenmeyers de 500 mL, les cellules sont placées sous agitation constante (135 rpm) à 22°C, en lumière constante (35 µmoles de photons.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>).



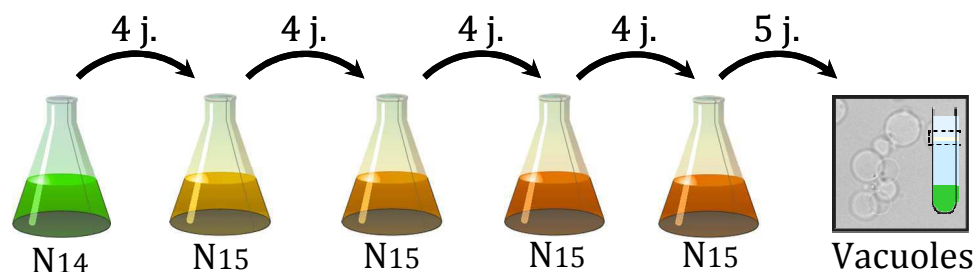
**Figure 26 : Photo de suspensions de cellules d'*Arabidopsis thaliana***

#### ***I.1.2 - Culture in vitro de suspensions de cellules d'Arabidopsis thaliana marquées à l'azote (N<sub>M</sub> = 15 g.mol<sup>-1</sup>)***

Le matériel végétal utilisé pour cette expérience est issu de la lignée cellulaire d'*Arabidopsis thaliana* var. Columbia décrite ci-dessus. Les cellules, photosynthétiques, sont repiquées le 5<sup>e</sup> jour en phase exponentielle de croissance dans un milieu de culture similaire au Murashig et Skoog dans lequel les apports en azote (ammonium NH<sub>4</sub><sup>+</sup> et nitrate NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) sous sa

forme légère (N14) sont remplacés par une autre forme de l'azote dite « lourde », l'isotope N15. L'ammonium et le nitrate « lourds » sont assimilés par les cellules en culture et métabolisés par celles-ci. Le N15 va progressivement constituer la structure des protéines au cours des repiquages successifs des cellules. Huit générations de cellules ayant poussées sur un milieu N15 sont nécessaires pour obtenir une incorporation de 98%. Toutes les protéines deviennent marquées sur l'ensemble de leurs résidus azotés. On obtient ainsi une population de cellules marquées N15.

Ces cultures (Figure 27) ont été réalisées afin d'observer l'évolution du protéome lors d'un stress cadmium, cette stratégie de protéomique quantitative est basée sur le marquage des protéines par un isotope stable. L'isotope d'azote (N15) possède des propriétés physico-chimiques identiques à l'azote (N14) naturellement abondant.



**Figure 27 :**  
Schéma des  
repiquages  
successifs en  
condition de  
culture N15

### **I.1.3 - Condition de stress métallique, culture *in vitro* de suspensions de cellules d'*Arabidopsis thaliana* en présence de cadmium**

Les cellules en cultures sont traitées avec des sels de cadmium ( $\text{CdCl}_2$ ) aux temps et concentrations désirées. Le cadmium est ajouté à 2h, 24h ou 72h avant la préparation de vacuoles, pour des concentrations finales en cadmium dans le milieu de culture de l'ordre de 5 $\mu\text{M}$ , 10 $\mu\text{M}$  ou 50 $\mu\text{M}$ .

### **I.1.4 - Cultures *in vitro* de plantules d'*Arabidopsis thaliana***

Les graines (*Arabidopsis thaliana* var. Col-0) sont stérilisées dans la solution de composition suivante : Javel 15 % [v / v], Triton X-100 0,02 % [v / v]. Deux lavages successifs de 1 min sont réalisés avec la solution de stérilisation, suivi de 5 lavages avec de l'eau stérile sous hotte. Les graines sont ensuite « semées » dans des ballons, 25 graines pour 50mL d'un milieu ½ MS (poudre basal medium (Sigma, ref. M0404) 0,22 % [p / v] ; saccharose 0,5 %



**Figure 28 : Photo de plantules d'*Arabidopsis thaliana* en culture *in vitro***

[p / v] ; MES 0,05 % [p / v] ; pH 5,7 ajusté KOH) et les ballons sont fermés avec de l'aluminium. Après 7 jours en phytotron<sup>27</sup>, sous 16 h de jour ( $120 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , 56 % d'humidité, 21°C) et 8 h de nuit (56 % d'humidité, 20°C), 50mL de milieu est ajouté. Les plantules (Figure 28) à 3 semaines sont prélevées pour être analysées.

### I.1.5 - Cultures *in vitro* de cals racinaires d'*Arabidopsis thaliana*

Les racines des plantules d'*A.t.* cultivées en milieu liquide sont prélevées à 3 semaines de culture en phytotron. Des segments de 2 à 4 cm de racines sont déposés sur un milieu gélosé favorisant la calogénèse en boîte de pétri. Après 4 semaines (Figure 29), les segments de racines sont transférés sur un nouveau milieu gélosé favorisant la calogénèse en boîte de pétri. Au bout de 4 nouvelles semaines, les cals sont transférés en milieu liquide et cultivés comme précédemment décrit en A.1.1.



Figure 29 : Photo de cals racinaires d'*Arabidopsis thaliana* en culture *in vitro*

## I.2 - Isolement et purification de vacuoles intactes d'*Arabidopsis thaliana*

### I.2.1 - Préparation de protoplastes (méthode adaptée de Van der Rest et al., 2002)

#### I.2.1.1 - Méthode appliquée aux suspensions de cellules d'*A.t.* photosynthétiques

La première étape du protocole de purification de vacuoles consiste à préparer des protoplastes à partir de cellules d'*A.t.* Les cellules en culture sont prélevées en phase exponentielle de croissance (5 jours après repiquage), rincées à l'eau et séchées sur papier filtre à l'aide d'une trompe à vide. Environ 20g de cellules sont incubées en présence de 20 mL de milieu de digestion (Mannitol 0,6 M ; MES 25 mM ; Cellulase 2 % [p / v] ; Pectolyase 0,5 % [p / v] ; pH 5,5) dans un cristallisateur à 30°C, sous agitation (70 rpm), pendant 2 h. La suspension obtenue est filtrée sur une toile à bluter de 52  $\mu\text{m}$  de vide de maille afin de retenir les cellules agrégées, tandis que les protoplastes passent à travers. Le filtrat est centrifugé 1 min à 1270 g et le surnageant éliminé. Le culot, contenant les protoplastes, est remis délicatement en

<sup>27</sup> Phytotron = installation utilisée en biologie végétale. Ce sont des pièces souvent aveugles dont tous les paramètres environnementaux sont contrôlés : humidité, température, éclairage par le biais de tubes au néon ou lampes sodium haute pression... Ceci permet de recréer des climats, des saisons, pour observer et analyser le comportement des plantes.

suspension dans un tampon de rinçage (Mannitol 0,7 M ; Tris-HCl 10 mM ; MES 15 mM ; pH 7,0). Après une nouvelle concentration par centrifugation, les protoplastes peuvent être observés au microscope et comptés sur lame de Malassez. Le nombre de protoplastes ainsi obtenu est de  $95 \times 10^6 (\pm 13 \times 10^6)$  par gramme de cellules.

#### I.2.1.2 - Méthode appliquée aux racines de plantules d'*A.t.*

Les protoplastes issus des racines proviennent du centre méristématique, de la zone corticale et de la coiffe racinaire. Les racines sont récoltées en phase exponentielle de croissance, 21 jours après la mise en culture. Elles sont séchées rapidement entre deux feuilles de papiers absorbants, 20 g sont pesées puis finement coupées à l'aide d'une lame de rasoir dans quelques gouttes de milieu de culture. La paroi des racines est digérée dans un milieu adapté à ces organes particuliers. Il faut ajouter au milieu de digestion précédemment cité de la Macérozyme 1 % [p / v]. La digestion s'effectue dans un cristalliseur à 30°C, sous agitation (70 rpm), pendant 1h30. Puis les étapes décrites ci-dessus sont réalisées. Le nombre de protoplastes ainsi obtenus est de  $3,0 \times 10^6 (\pm 0,1 \times 10^6)$  par gramme de racines fraîches.

## I.2.2 - Isolement de vacuoles

### I.2.2.1 - Méthode du gradient unique (adaptée de Frangne *et al.*, 2002)

La rupture ménagée de la membrane des protoplastes est effectuée de façon à préserver les vacuoles d'un choc osmotique (Figure 30). Les protoplastes sont dilués trois fois dans un milieu hypotonique également nommé milieu de lyse (*milieu A* : mannitol 0,2 M; ficoll 10 % [p / v] ; EDTA 20 mM ; HEPES-KOH 5 mM ; pH 8 ; préchauffé à 42°C). L'ensemble, protoplastes et milieu de lyse, est maintenu à 25°C pendant 15 min. C'est à partir de ce lysat de protoplastes que les vacuoles sont purifiées sur un gradient de densité discontinu composé de Ficoll. À partir de cette étape et jusqu'à la fin de ce protocole expérimental, toutes les manipulations se font à 4°C. Dans un tube de centrifugation de 40 mL (*tube SS34, Sorvall*), sont déposés successivement un volume (10 mL) de protoplastes lysés, deux volumes d'un mélange 1:2 [v:v] des milieux A et B (*milieu B* : bétaine 0,4 M ; KCl 30 mM ; HEPES-KOH 20 mM ; pH 7,5), et un volume de milieu B. Ce gradient est centrifugé 30 min à 1500 g, dans un rotor à godets oscillants, en prenant soin de lancer la rotation progressivement afin de ne pas altérer la répartition des 3 couches de Ficoll. Les vacuoles, qui montent par flottaison dans le gradient, sont prélevées à l'interphase des milieux A+B (3% ficoll) et B (0% ficoll). Du milieu B (1/10<sup>e</sup> du volume prélevé) est ajouté à la suspension de vacuoles obtenues. Afin de concentrer les vacuoles prélevées, une dernière centrifugation est effectuée, à 1800 g pendant 20 min. Le surnageant est éliminé et le culot de vacuoles pures et intactes (20 µL en moyenne) est délicatement prélevé et conservé à -80°C.

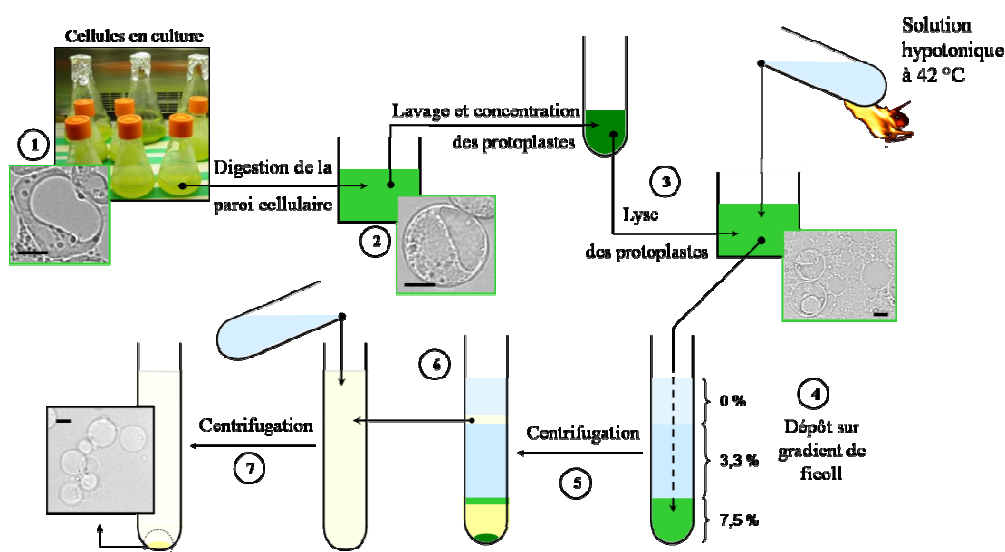


Figure 30 : Schéma du protocole expérimental de purification de vacuoles par la méthode du simple gradient.

### I.2.2.2 - Méthode du double gradient (adaptée de Jaquinod *et al.*, 2007)

Pour cette version du protocole (Figure 31), les vacuoles sont purifiées sur deux gradients successifs. Le lysat de protoplastes est réparti en premier au fond des 6 tubes de centrifugation (*tube SS34, Sorvall*). Des couches de 5% et 0% de Ficoll sont déposées au dessus (la couche intermédiaire est composée d'un mélange 1:1 [v:v] des milieux A et B). Ce gradient en trois couches 7,5 % - 5 % - 0 % de Ficoll est centrifugé (1500 g, 20 min, 4°C). Après centrifugation, les vacuoles sont récoltées à l'interphase des milieux 5 % et 0 %. La suspension de vacuole obtenues est supplémenté avec 1/20<sup>e</sup> de Ficoll 10 %, puis ce volume est complété avec du milieu 5 % jusqu'à atteindre un volume suffisant de 40 mL. Cette suspension est alors répartie au fond de 2 tubes de centrifugation afin de réaliser un second gradient discontinu. Vingt millilitres de suspension de vacuoles sont recouverts de 15 mL d'un mélange 1:2 [v:v] des milieux A et B (3,3 % de Ficoll), et de 5 mL de milieu B (0% de Ficoll). Ce second gradient est centrifugé (1500 g, 20 min, 4°C), et les vacuoles purifiées sont récoltées à l'interphase des milieux milieux A+B (3% ficoll) et B (0% ficoll), puis sont concentrées et récoltées comme décrit précédemment (60 µL en moyenne).

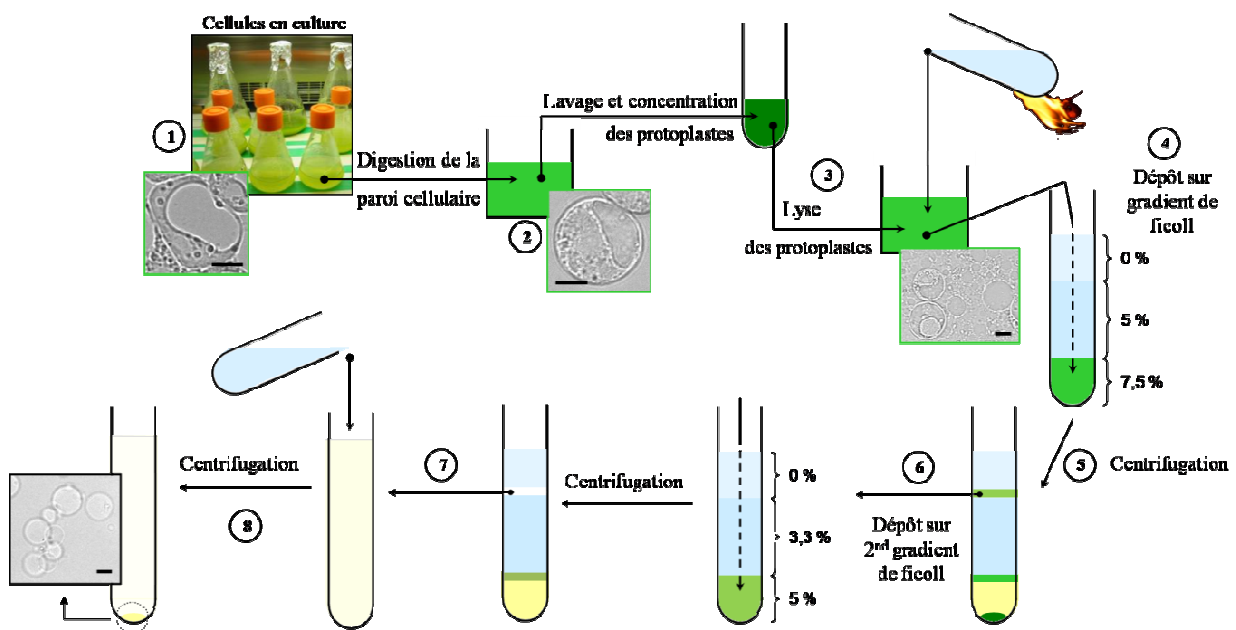


Figure 31 : Schéma du protocole de purification de vacuoles par la méthode du double gradient.

### **I.3 - Extraction de fractions enrichies en cytosol**

Le protocole mis en place pour purifier les vacuoles est basé sur une lyse osmotique douce des protoplastes. La rupture ménagée de la membrane des protoplastes permet la libération d'un contenu cellulaire préservé dans l'ensemble. Les différents organites de la cellule sont intacts dans le lysat, le cytosol cellulaire est peu contaminé par les protéines des matrices des différents organites tels que les mitochondries ou chloroplastes par exemple.

#### **I.3.1 - Isolement de fractions enrichies en cytosol**

Après la centrifugation du lysat de protoplastes, sur le 1<sup>er</sup> gradient de Ficoll, il est possible d'extraire une fraction fortement enrichie en cytosol. Les organites du lysat cellulaire sont majoritairement sédimentés sous forme d'un culot tandis que les protoplastes sont remontés au niveau de la 1<sup>ère</sup> interface, et les vacuoles au niveau de la 2<sup>nd</sup> interface. La fraction enrichie en cytosol est disponible entre le culot et l'interface des 2 premières couches du gradient de Ficoll. Cette fraction est alors centrifugée (15 min, 20 000 g) pour éliminer les éventuels organites restants, puis une dernière centrifugation à haute vitesse (30 min, 100 000 g) permet de séparer de la fraction cytosolique soluble d'éventuels débris membranaires résultant de la lyse du plasmalemmes.

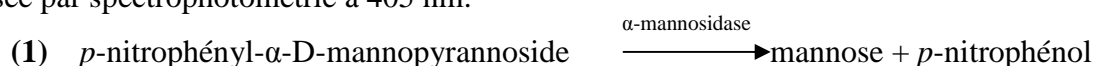
### **I.4 - Evaluation de la qualité des préparations de vacuole**

#### **I.4.1 - Observation microscopique**

En première approche, le degré de purification et le rendement des préparations des vacuoles ont pu être estimés par observations microscopiques. A l'aide d'un microscope à transmission à champs clair, ou en épifluorescence à 365 nm, longueur d'onde d'excitation à laquelle la chlorophylle fluoresce en rouge, les vacuoles apparaissent en bleu clair. Cette émission naturelle de fluorescence bleue par les vacuoles est probablement due à l'excitation à 365 nm des composés phénoliques contenus dans le suc vacuolaire. Les vacuoles peuvent être comptées sur lame de Malassez. Le nombre de vacuoles ainsi obtenu est de  $15 \times 10^6$  ( $\pm 2 \times 10^6$ ) par gramme de cellules.

### I.4.2 - Activité enzymatique de l' $\alpha$ -mannosidase (méthode adaptée de Boller & Kende, 1979)

En seconde approche, le rendement de purification des vacuoles a été mesuré à l'aide d'un marqueur enzymatique spécifique de celles-ci, l' $\alpha$ -mannosidase, qui catalyse la réaction (1, cf. ci-dessous). Dix à cinq cent microgrammes de protéines (vacuolaires ou protoplastiques) sont ajoutés à 1,5 mL du milieu réactionnel suivant : acide citrique 50 mM (pH 5) ; *p*-nitrophényl- $\alpha$ -D-mannopyrannoside 1 mM. La réaction est conduite à 37°C. Une aliquote de 450  $\mu$ L est prélevée à 15, 30 et 45 min de réaction et l'ajout de 720  $\mu$ L de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1 M) permet d'arrêter la réaction. Après centrifugation (15 min à 16 000 g), les protéines précipitées sont éliminées et la concentration de *p*-nitrophénol ( $\epsilon_{\text{pNP}} = 18,5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) libérée par la réaction, est dosée par spectrophotométrie à 405 nm.



## I.5 - Préparation des échantillons protéiques vacuolaires

### I.5.1 - Séparation des différentes fractions vacuolaires

#### I.5.1.1 - Séparation simple des fractions membranaire et soluble vacuolaires

Après 2 cycles de congélation / décongélation, les vacuoles lysées sont centrifugées (100 000 g, 30 min à 4°C) afin d'analyser séparément les protéines tonoplastiques (présentes dans le culot membranaire) et les protéines solubles (présentes dans le surnageant).

#### I.5.1.2 - Séparation exhaustive des fractions soluble, associée et membranaire vacuolaires

Après 2 cycles de congélation / décongélation, les vacuoles lysées sont centrifugées (100 000 g, 30 min à 4°C). Le surnageant qui correspond à la fraction soluble est isolé. Le culot de membranes subit deux lavages-centrifugation successifs (tampon 1 : Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 100mM pH 7 ; tampon 2 : KCl 500mM pH 7) les 2 surnageants sont prélevés et assemblés dans le même tube, y sont présentes les protéines associées à la membrane. Enfin le culot est repris dans une solution de TRIS 25 mM pH 7.



## **I.5.2 - Précipitation des protéines**

Afin de concentrer les protéines solubles, la précipitation des protéines puis leur re-solubilisation permet d'obtenir une concentration déterminée dans un volume restreint.

### **I.5.2.1 - Précipitation des protéines au TCA**

Ajouter du trichloro acid acétique (TCA) 80% à l'échantillon afin d'atteindre une concentration finale de 12,5 % (dilution 1/8<sup>e</sup>). Incuber 1h dans la glace à 4°C, puis centrifuger à 4°C pendant 15 min à 16000g. Laver le culot avec 350 µL d'Acétone conservé à -20°C, puis centrifuger de nouveau. Laisser sécher le culot à l'air libre à température ambiante et reprendre le culot dans du tampon Laemmli.

## **I.5.3 - Dosage des protéines vacuolaires**

### **I.5.3.1 - Dosages des protéines vacuolaires (Bradford, 1976)**

Le dosage des protéines a été réalisé selon la méthode de Bradford (1976), basé sur la fixation du bleu de coomassie aux acides aminés acides et aromatiques. Ces dosages sont effectués en triplicats sur chaque échantillon. Dans un volume final ajusté avec de l'eau à 800 µL, 2 à 20 µL d'échantillons sont dosés. Puis 200 µL de réactif (*Brillant blue G250 14,92 mg, Ethanol 7,5 mL, Acide orthophosphorique 85%*) sont ajoutés. Après incubation pendant 10 min à température ambiante et à l'obscurité, l'absorbance à 595 nm est mesurée au spectrophotomètre et la concentration en protéines est calculée grâce à une courbe étalon établie avec de la BSA (Bovine Serum Albumine). Les échantillons contiennent des teneurs en protéines comprises entre 1 et 20 µg.

## **I.5.4 - Tampon de charge avant dépôt sur gel SDS-PAGE**

Les échantillons avant d'être déposés dans leurs puits respectifs sur gel, sont bouillis de 1 à 5 minutes dans une solution tampon tel que du Laemmli. Ce tampon de charge contient une substance tampon, généralement du Tris ; un colorant, du bleu de bromophenol ; un composant sulfhydryl, typiquement du beta-mercaptoéthanol ou du dithiothréitol = DTT ; un détergent anionique lipophile, sodium dodécyl sulfate = SDS et du glycérol pour augmenter la densité de l'échantillon.

I.5.4.1 - Tampon de Laemmli (Laemmli, 1970)

Tampon de Laemmli 5X : mélanger 5mL de Tris-HCl (0.5M, pH 6.8), 2g de SDS, 4g de glycérol, 5mL de  $\beta$ -mercaptoéthanol, 1,25mL de Bleu de bromophénol 1%, qsp 20mL d'eau Ultrapure. Aliquoter le tampon par 1 mL et le conserver à -20°C pendant 1 an maximum.

I.5.4.2 - Tampon de Laemmli sans réducteur

Tampon de Laemmli 4X : mélanger 2mL de Tris-HCl (1M, pH 6.8), 4 mL de SDS 10%, 4 mL de glycérol, 1,25mL de Bleu de bromophénol 1%, qsp 10mL d'eau Ultrapure. Aliquoter le tampon par 1 mL et le conserver à -20°C pendant 1 an maximum.

## ***II - Caractérisation biochimique des échantillons***

### ***II.1 - Séparation d'échantillons protéiques par électrophorèse***

#### ***II.1.1 - Séparation des protéines par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes***

##### ***II.1.1.1 - Electrophorèse à une dimension, SDS – PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis)***

###### ***a) Méthode SDS-PAGE classique***

Les protéines sont séparées par SDS-PAGE (12 % d'acrylamide) selon la méthode décrite dans Sambrook et Russell (2001). Les échantillons protéiques sont solubilisés par chauffage dans du tampon Laemmli. Dix à vingt microgrammes de protéines sont déposés par puits. Les gels sont constitués d'une première partie dite de concentration (*stacking* : acrylamide 5 % [p / v], pH 6,8), et d'une seconde dite de résolution (*resolving* : acrylamide 12 % [p / v], pH 8,8). Le tampon d'électrophorèse TGS (Tris-HCl 25 mM ; Glycine 129 mM ; SDS 0,1 % [p / v], pH 7,3) est identique à l'anode et à la cathode. L'électrophorèse se déroule à température ambiante, à un voltage de 60 V pendant 20 min, puis à 150 V pendant 2 à 40 min. Les protéines ainsi séparées en fonction de leur masse moléculaire peuvent ensuite être révélées par coloration, transférées sur membrane ou analysées par spectrométrie de masse.

###### ***b) Méthode NuPage Invitrogen®***

L'électrophorèse des protéines est réalisée par cette méthode à l'aide de gels pré-coulés (NuPage Invitrogen®). Les échantillons protéiques sont solubilisés par chauffage dans du tampon Laemmli. Dix à vingt microgrammes de protéines sont déposés par puits. Le tampon d'électrophorèse 1X utilisé est soit du :

- NuPage MOPS SDS running buffer 20X : MOPS 1M ; Tris Base 1M ; SDS 2% [p / v] et EDTA 20mM, qsp d'eau Ultrapure. Le pH sans être ajuster doit être de 7,7 pour la solution finale 1X.
- NuPage MES SDS running buffer 20X : MES 1M ; Tris Base 1M ; SDS 2% [p / v] et EDTA 20mM, qsp d'eau Ultrapure. Le pH sans être ajusté doit être de 7,3 pour la solution finale 1X.

Dans le tampon cathode (qui traverse le gel) 0,25 % [v : v] de NuPage antioxidant sont ajoutés. L'électrophorèse se déroule à température ambiante, à un voltage de 200 V pendant un temps

variable selon la migration désirée. Les protéines ainsi séparées peuvent ensuite être révélées par coloration, transférées sur membrane ou analysées par spectrométrie de masse.

### II.1.1.2 - Les différents types de migration (adapté du protocole EDyP qualité

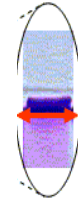
SERV\_REF\_002 – 01/07/2009)

#### a) *Migration « Stacking »*

La migration est extrêmement courte, la séparation se fait sur 1 à 3 mm lorsque tout l'échantillon est rentré dans le gel de séparation

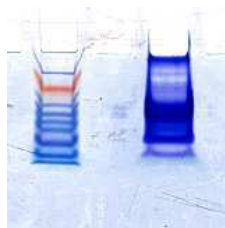
gel « home-made » :

gel NuPage :



#### b) *Migration « Pseudo-separating »*

La migration se fait sur 1 à 2 cm



#### c) *Migration*

La migration est complète, la la longueur de la piste

« *Separating complet*»

séparation se fait sur toute électrophorétique.

La séparation dans le gel de résolution est stoppée lorsque le front de migration est en bas du gel.



### II.1.1.3 - Electrophorèse à deux dimensions, IEF / SDS-PAGE (IsoElectroFocusing / ...)

Les cartographies protéiques par électrophorèse bidimensionnelle ont été réalisées en collaboration avec Thierry Rabilloud (Laboratoire BBSI, CEA - Grenoble). Les protéines sont séparées en fonction de leur point isoélectrique au cours de la première dimension (focalisation isoélectrique, ou IEF) puis en fonction de leur masse moléculaire au cours de la deuxième dimension (Figure 32). Cent soixante quinze microgrammes de protéines (vacuolaires ou cytosoliques) sont solubilisés dans 400  $\mu$ L d'une solution de composition : urée 7 M; thiourée 2 M; CHAPS 4 % [p / v]; DTT 20 mM et ampholytes. L'isofocalisation électrique est réalisée sur une bande de gel (ou strip) de gradient de pH 3 - 6,75. La focalisation se fait en plusieurs étapes au cours desquelles le voltage est peu à peu augmenté : 12 h à 50 V, 4 h à 250 V, 7 h à 1000 V, et enfin 12 h à 7500 V. Le bas voltage permet d'éliminer les sels, et l'augmentation progressive permet d'éviter une surchauffe du strip et son imbibition progressive dans l'huile minérale. Après la focalisation, le strip est placé au sommet d'un gel de polyacrylamide 12 % puis recouverte et incluse dans une solution d'agarose à bas point de fusion (Agarose 1 % [p / v] ; SDS 0,2 %; Bis-Tris 0,15 M ; bleu de bromophénol 0,002 % (indicateur de migration)). L'agarose permet de maintenir un milieu solide entre les deux gels et d'éviter que les protéines ne diffusent latéralement. La migration de la deuxième dimension se déroule à température ambiante, à un voltage fixe de 25 V pendant 1 h puis à un voltage fixe de 300 V pendant 5 h. Le gel obtenu est incubé dans une solution d'acide acétique 10 % [v / v] et de méthanol 50 % [v / v] avant d'être coloré avec du bleu de Coomassie colloïdal.

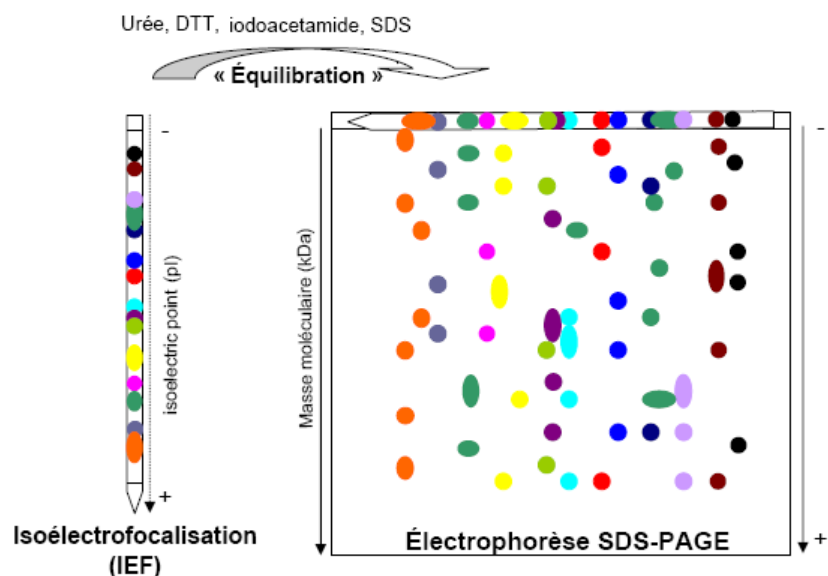


Figure 32 : Schéma du principe de l'IEF / SDS-PAGE

## II.1.2 - Séparation des protéines par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions non dénaturantes :

### Blue Native PAGE (méthode adaptée de Schagger & von Jagow, 1991)

Cette technique a été développée initialement par Schägger et von Jagow pour isoler les complexes respiratoires de la mitochondrie, puis a été utilisée chez les plantes pour caractériser la chaîne photosynthétique chloroplastique. Cette électrophorèse bidimensionnelle (Figure 33) permet de séparer les complexes protéiques d'un échantillon en préservant les associations de protéines qui les composent lors de la première dimension puis de les dissocier dans la seconde dimension en conservant l'information de filiation. Du bleu de Coomassie G250, connu pour sa capacité à lier les protéines, est utilisé ici pour les charger sans les dénaturer. Le tampon d'électrophorèse à la cathode contenant également du bleu, le gel d'acrylamide est totalement coloré de bleu après migration d'où le nom Blue Native gel.

#### II.1.2.1 - BN-PAGE : Première dimension

##### a) *Méthode pour les échantillons solubles*

L'échantillon de protéines solubles (100 µg au minimum) correspondant au suc vacuolaire est concentré sur une unité d'ultrafiltration dont le seuil d'exclusion est de 3 kDa (*nanosep Filtron*, « cut off » 3kD) par centrifugation à 5000 g à 4°C, la durée variant selon le volume. Du tampon de filtration (NaCl 50 mM ; acide amino-caproïque 5 mM ; imidazole-HCl 50 mM, pH 7) est ajouté sur l'extrait qui est de nouveau centrifugé. Après filtration la concentration finale est d'environ 1 µg.µL<sup>-1</sup>. Du glycérol 8% est ajouté au 1/10<sup>e</sup> dans l'échantillon afin de l'alourdir. Cent à 150 µg de protéines sont déposés par puits. Le gel est constitué d'un gradient d'acrylamide (5 % - 13 % [p / v]) dans un milieu d'acide amino-caproïque (500 mM) et d'imidazole-HCl (25 mM, pH 7). Le gel de concentration ne contient que 4 % d'acrylamide dans un milieu de composition identique. Le tampon cathode (qui traverse le gel) est dans un premier temps composé de tricine (50 mM), imidazole (7,5 mM) et bleu de Coomassie G250 0,02 ‰ [p / v], puis remplacé après environ 2/3 de migration du gel par un tampon contenant 10 fois moins de bleu (0,002 ‰ [p / v]). Le tampon anode est constitué d'imidazole-HCl (25 mM, pH 7). L'électrophorèse se déroule en chambre froide à 4°C sous un voltage constant de 60 V pendant 2h puis de 250 V pendant 3h.

### b) Méthode pour les échantillons membranaires

Le culot membranaire est repris dans un tampon détergent (acide amino-caproïque 750 mM ; dodécylmaltoside 1 % [p / v] ; Bis-Tris 50 mM, pH 7), à une concentration protéique finale de  $5 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ . L'échantillon, de 100  $\mu\text{g}$  de protéines minimum, est incubé 1 h dans la glace, puis centrifugé à 100 000 g, à 4°C, pendant 30 min. Le surnageant contenant les protéines solubilisées par le détergent est prélevé et le bleu de Coomassie est ajouté à raison de 0,5 % [p / v]. La totalité de l'échantillon est ensuite déposée dans un puits. Pour les échantillons membranaires, la composition des tampons est modifiée, l'imidazole est remplacé par du Bis Tris. Le tampon du gradient de gel d'acrylamide (5 % - 13 % [p / v]) est le suivant : acide amino-caproïque (500 mM) et Bis-Tris (50 mM) à pH 7. Le tampon cathode est composé de Tricine (50 mM), Bis-Tris (15 mM) et Bleu de Coomassie G250 (0,02 ‰ ou 0,002 ‰ [p / v]), et le tampon anode de Bis-Tris (50 mM) à pH 7. L'électrophorèse se déroule, de façon identique, en chambre froide à 4°C sous un voltage constant de 60 V pendant 2h puis de 250 V pendant 3h à 4h.

#### II.1.2.2 - BN-PAGE : Seconde dimension

La piste de migration électrophorétique obtenue en première dimension est découpée puis incubée 30 min dans du tampon d'électrophorèses SDS-PAGE (TGS) supplémenté en SDS (1 % [p / v]) et en  $\beta$ -mercaptoéthanol (1 % [v / v]). Ce bain permet de dénaturer les protéines constituant les complexes *in gel*. La bande de gel est ensuite rincée 3 fois 10 min dans de l'eau et placée à l'horizontale au dessus d'un gel 12% de type SDS-PAGE. La migration de la seconde dimension s'effectue alors à température ambiante et à voltage constant 60V pendant 1h30 puis 200V pendant 2h30. Le gel est ensuite préférentiellement coloré au Nitrate d'argent.

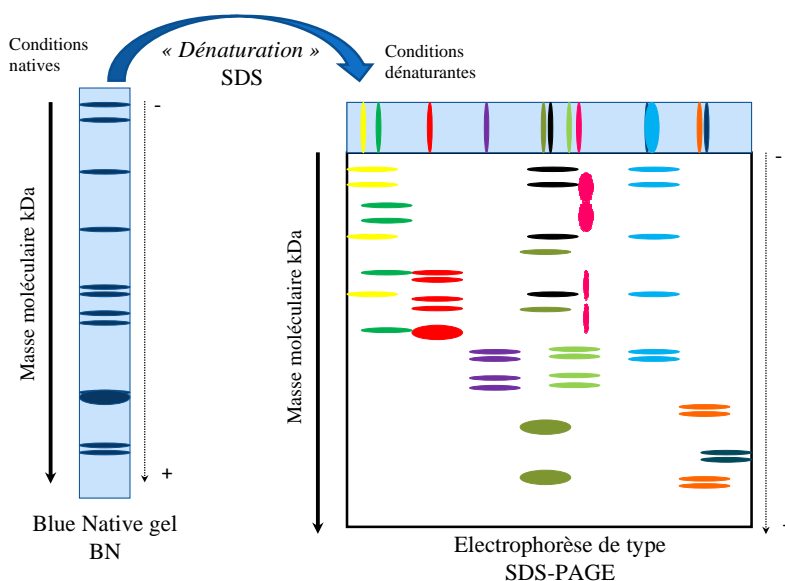


Figure 33 : Schéma du principe des BN-PAGE

## II.1.3 - Coloration des gels

### II.1.3.1 - Coloration au bleu de Coomassie

La coloration au bleu de Coomassie est réversible par des lavages successifs avec des solvants organiques. Le principe de cette coloration est basé sur la fixation du bleu de Coomassie aux acides aminés basiques et aromatiques. Les liaisons covalentes des protéines ne sont pas affectées, cette méthode est compatible avec la masse (Winkler *et al.*, 2007). La limite de détection est de 20 ng de protéines.

#### a) *Bleu de Coomassie non colloïdale*

Le gel est placé dans une solution de composition méthanol 50 % [v / v] ; acide acétique 10 % [v / v] ; bleu de Coomassie R250 0,005 % [p / v]. Après 15 à 30 min, le milieu de coloration est éliminé et remplacé par un milieu décolorant (méthanol 50 % [v / v] ; acide acétique 10 % [v / v]), jusqu'à visualisation des protéines.

#### b) *Bleu de Coomassie colloïdale (Candiano et al., 2004)*

Le gel est incubé 2 h dans une solution de bleu de Coomassie colloïdal (méthanol 34 % [v / v] ; acide o-phosphorique 2 % [v / v] ; sulfate d'ammonium 17 % [p / v] ; bleu de Coomassie G250 0,065 % [p / v]). La coloration spécifique des protéines à l'intérieur du gel est totale après 1 à 2 jours d'incubation. Le gel est ensuite conservé dans une solution d'acide acétique 5 % [v / v].

### II.1.3.2 - Coloration au nitrate d'argent

La coloration au nitrate d'argent est normalement irréversible mais il est possible de réaliser une coloration à l'AgNO<sub>3</sub> compatible avec une analyse en spectrométrie de masse. Pour cela il faut limiter le temps d'action du nitrate d'argent, afin qu'il ne pénètre pas totalement dans le gel et que des protéines intactes « compatible avec la masse » soient encore disponibles au cœur du gel. La méthode décrite ci-dessous se différencie des méthodes de révélation classique, non compatibles, par l'absence de glutaraldéhyde qui entraîne la réticulation<sup>28</sup> des protéines (Schvchenko *et al.*, 1996). La coloration au nitrate d'argent n'est pas spécifique, la fixation se fait sur les résidus amines, les acides aminés basiques et les groupements soufrés. La limite de détection des protéines est de 5 ng.

Le gel est placé dans plusieurs bains successifs sous agitation (100 rpm) afin de révéler les protéines par une coloration à l'argent. Les protéines sont dans un premier temps fixées dans un bain d'éthanol 30 % [v / v], acide acétique 10 % [v / v] pendant 7 min, puis le gel est

---

<sup>28</sup> Réticulation = Formation de liaisons chimiques covalentes entre les chaînes d'atomes de plusieurs protéines.



transféré dans une solution identique supplémentée avec du thiosulfate de sodium (2,5 mM) pendant 7min. Le thiosulfate va permettre de faire précipiter les ions argent sous forme d'un sel ( $\text{AgSCN}$ ). Après 3 rinçages à l'eau de 3min chacun, le gel est placé dans la solution d'argent ( $\text{AgNO}_3$  0,1 % [p / v] ; formaldéhyde 0,075 %) et incubé 7 min à l'obscurité. Le gel est alors rincé brièvement à l'eau puis les protéines sont révélées dans une solution contenant du  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (2,5 % [p / v]) et du formaldéhyde (0,075 %). La réaction de coloration est ensuite stoppée par ajout d'acide acétique pur (10 % du volume).

## **II.2 - Analyses des protéines par immunodétection (Western-blot)**

### **II.2.1 - Transfert des protéines sur membrane**

Après séparation de l'échantillon par SDS-PAGE classique (en condition dénaturante), le gel de polyacryamide est monté en sandwich avec la membrane de transfert entre des feuilles de papier Watman. Il faut veiller à toujours placer le gel du côté de la cathode (-) et la membrane du côté anode (+). Les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose pendant 2 h à 80 V dans un tampon TGS 80 % [v / v] ; éthanol 20 % [v / v]. Après transfert (*Mini Protean III electro module, BioRad, USA*), la membrane est lavée dans un tampon de rinçage (TBST) :  $\text{NaCl}$  150 mM ; Triton X100 0,05 % [p / v] ; Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), et incubée 5 min dans une solution de rouge ponceau (rouge ponceau 0,1 % [p / v] ; acide trichloroacétique 0,5 % [p / v]) afin de vérifier le transfert des protéines.

### **II.2.2 - Immunorévélation des protéines**

La membrane est saturée, 1h sous agitation, dans le tampon de rinçage (TBST) auquel on ajoute 7 % [p / v] de lait écrémé en poudre, puis rincée brièvement dans du TBST sans lait. La première incubation s'effectue pendant 3h sous agitation, à température ambiante, en présence de l'anticorps primaire (solution TBST ; lait 5% ; Ac I<sup>R</sup>). Après 3 rinçages de 10 min chacun dans le tampon sans lait, la seconde incubation s'effectue 1h sous agitation, à température ambiante, en présence de l'anticorps secondaire (solution TBST ; Ac II<sup>R</sup>). L'anticorps secondaire, couplé à la peroxydase, est dirigé contre un épitope constant du premier anticorps afin de le reconnaître et de s'y fixer. Après 3 rinçages de 10 min chacun dans le tampon sans lait, on procède à la dernière étape, la révélation (tampon de révélation de composition : luminol 1,25 mM ; acide coumaric 0,2 mM ;  $\text{H}_2\text{O}_2$  0,025 % [v / v] ; Tris-HCl 100 mM, pH 8,5). La peroxydase catalyse une réaction redox-ox en présence d'  $\text{H}_2\text{O}_2$ , libérant un photon. A l'aide d'un film autoradiographique sensible à l'émission de lumière, la protéine recherchée peut être détectée. Le film autoradiographique est développé comme une

photographie dans un tampon révélateur puis fixateur (*Kodak®*). *Nota Bene* : Les anticorps primaires utilisés sont décrits dans la partie résultats.

### **II.2.3 - Déhybridation de la membrane**

La membrane de nitrocellulose immunohybridée peut être restaurée dans son état initial, juste après transfert, afin de réaliser une nouvelle immunorévélation.

#### **II.2.3.1 - Déhybridation au Restore (Pierce®)**

Le restore est un tampon qui va permettre de détacher les anticorps primaire et secondaire fixés aux protéines sur la membrane. A température ambiante, incuber la membrane en présence du tampon pendant 5 à 15 min puis rincer 2 fois avec du TBST.

#### **II.2.3.2 - Déhybridation en milieu acide**

##### *a) Solution acide acétique*

La membrane immunohybridée est déhybridée, 20 min sous agitation à 25°C, dans une solution d'acide acétique 0,5 M ; NaCl 0,5 M. Rincer brièvement une fois à l'eau, puis 2 fois 10 min avec du TBST.

##### *b) Solution glycine*

La membrane immunohybridée est déhybridée, 30 min sous agitation à 25°C, dans une solution de glycine-HCl (25 mM, pH 2). Rincer brièvement une fois à l'eau, puis 2 fois 10 min avec du TBST.

## ***III - Analyses protéomiques***

### **III.1 - Introduction au processus d'identification des protéines par spectrométrie de masse**

#### **III.1.1 - Principe de la spectrométrie de masse**

La spectrométrie de masse est une technique analytique qui permet de mesurer la masse moléculaire<sup>29</sup> d'une molécule. Les différents atomes de cette molécule forment un ensemble d'éléments isotopiques qui sont détectés sous forme de pics massiques. Les massifs isotopiques reconstitués forment les spectres de masse des molécules que l'on cherche à identifier.

---

<sup>29</sup> Masse moléculaire = masse de l'ensemble des atomes d'une molécule

Lorsqu'on utilise des instruments de spectrométrie de masse pour identifier des molécules de l'ordre du kiloDalton (kDa)<sup>30</sup>, soit des protéines, on entre dans le domaine de la protéomique.

Afin de mener à bien une identification, l'échantillon biologique protéique suit classiquement le processus suivant :

- Digestion sous forme de peptides
- Introduction dans le système par chromatographie liquide
- Ionisation – désorption au niveau de la source du spectromètre de masse
- Analyse MS, MS/MS, SRM... (instrument dépendant)
- Détection du signal
- Traitement du signal par des systèmes informatisés

### **III.1.2 - Planification des analyses dans ePims**

**ePims** (experiment Proteomic Information Management System) est un système de gestion des informations de laboratoire (ou LIMS en anglais) dédié aux données de spectrométrie de masse développé par l'équipe informatique du laboratoire EDyP (<http://edyp-epims:8008/ePims/>). Mes activités sont donc organisées selon une hiérarchie définie en programme de recherche (Toxicologie Nucléaire), projet scientifique (vacuole) et études (à chaque nouvelle expérience, Figure 34). ePims permet la gestion et la planification des échantillons, on peut y suivre les différentes étapes de traitement qu'il s'agisse d'une digestion trypsique sur le robot ou d'un passage en spectrométrie de masse. Cet outil permet également le transfert des données électroniques résultant des acquisitions sur les spectromètres de masses, leurs stockages et archivages.

---

<sup>30</sup> **kiloDalton** (kDa) = unité de masse atomique calculée expérimentalement utilisé en biologie, la plupart des molécules cellulaires ont une taille comprise entre 20 et 100 kDa. Les acides aminés ont une masse moyen de 110 Da.

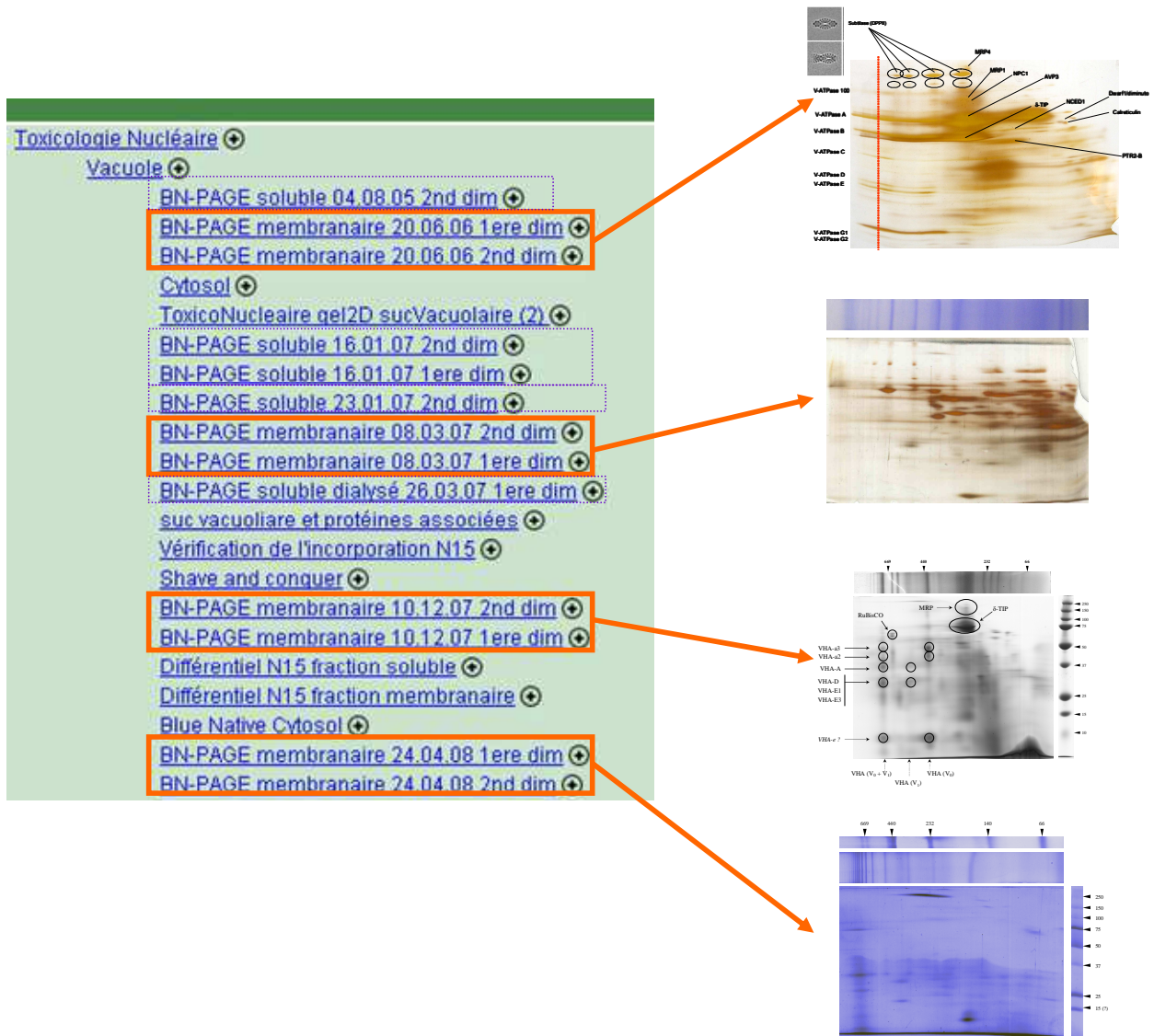


Figure 34 : Copie d'écran ePims illustrant la hiérarchie des activités

## **III.2 - Pipeline d'identification des protéines par spectrométrie de masse**

### **III.2.1 - Digestion des protéines**

Les digestions des échantillons *in gel* sont ponctuellement réalisées à la main mais sont majoritairement réalisées sur le robot (Tecan) grâce au savoir faire d'Alexandra Kraut (membre de la plate-forme EDyP).

#### **III.2.1.1 - Digestion des échantillons *in gel* (Kraut et al., 2009)**

La piste de migration électrophorétique est découpée en bandes d'environ 1 mm. Chaque bande de gel protéique est lavée plusieurs fois par incubation 15 min dans du bicarbonate d'ammonium ( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  25mM) puis 15 min dans un mélange acétonitrile, bicarbonate d'ammonium ( $\text{CH}_3\text{CN} : \text{NH}_4\text{HCO}_3$  25mM [50 : 50]). Les bouts de gel sont ensuite déshydratés dans de l'acétonitrile 100 %, puis incubés avec une solution d' $\text{H}_2\text{O}_2$  7 %, 15 min avant de réitérer un cycle de lavage - déshydratation comme décrit précédemment. Les bandes déshydratées sont ensuite incubées toute la nuit à 37°C dans une solution de digestion ( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  25mM) contenant 0,15 µg de trypsine modifiée (Promega, Madison, WI, sequencing grade). Les peptides protéolytiques sont extraits des bandes de gel par 3 étapes d'extraction séquentielle. Les surnageants de ces bains de 30 µL, sous sonication, d'acétonitrile 50%, puis d'acide formique 5% et enfin d'acétonitrile 100% sont assemblés et séchés sous vide.

#### **III.2.1.2 - Digestion des échantillons en solution**

La fraction membranaire est remise en suspension dans 80 µL de bicarbonate d'ammonium ( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  25 mM, pH 8,1) et chauffée à 90°C pendant 10 min. La dénaturation est alors stoppée par 120 µL de méthanol froid à -20°C. La digestion est réalisée sur la nuit, à 37°C, avec un rapport trypsine / substrat de 1 %. Enfin, du tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP) hydrochloride est ajouté pour atteindre une concentration finale de 10 mM et la réduction des peptides réalisée pendant 30 min à 37°C. Les peptides tryptiques sont enfin déshydratés dans 25 µL d'acétonitrile 5 % et d'acide formique 0,2 %.

### III.2.2 - Analyses NanoLC-MS/MS

L'ensemble des analyses MSMS a pu être réalisée grâce au Laboratoire EDyP, et plus particulièrement aux membres de la plateforme passés et présents, Lauriane Kuhn, Audrey Bullet, Sylvie Kieffer-Jaquinod et Yohan Couté.

Les peptides tryptiques extraits secs sont remis en suspension dans une solution d'acétonitrile 4 % et d'acide tri-fluoro-acétique 0,5 % extemporanément à l'injection. L'analyse des peptides est réalisée sur une chaîne de type nanoLC-MS/MS (Ultimate 3000, Dionex et LTQ-Orbitrap, Thermo Fischer Scientific). La méthode de chromatographie liquide sur la nanoLC consiste en un gradient de 40 minutes allant de 5 % [v / v] d'acétonitrile à 55 % [v / v] avec 0,1% [v / v] d'acide formique à un débit de 300 nL.min<sup>-1</sup>. L'échantillon de 10 µL est injecté sur une précolonne PepMap µC<sub>18</sub> (300 µm x 5 mm, Dionex, Sunnyvale, CA) puis séparé en fonction de l'hydrophobicité des peptides sur colonne µC<sub>18</sub> (75 µm x 150 mm, Gemini C18, Phenomenex). Le spectromètre de masse est calibré sur les ions générés par la fragmentation du Glu-fibrinopeptide B. Les données MS et MS/MS sont acquises en utilisant Xcalibur (Thermo Fischer Scientific) et traitées automatiquement par le logiciel Mascot Daemon (version 2.2, Matrix Science). Des recherches consécutives sont lancées pour chaque échantillon en utilisant une version interne de Mascot 2.2 contre la base de données Arabidopsis complete\_decoy (Tair 9 plus contaminants). Les paramètres de recherches sont les suivants : l'enzyme choisie est la trypsine/proline, un « missed cleavage » est autorisé, l'instrument choisie est ESI-TRAP, la tolérance de masse sur les précurseurs et les fragments sont respectivement de 5 ppm et 1 Da, et la charge des peptides limitée au +2 et +3. Les modifications peptidiques autorisées pendant la recherche sont l'acétylation de la séquence N-terminale de la protéine (acetyl (N-ter)), les oxydations et dioxydations des méthionines (oxidation (M), dioxidation (M)) et la trioxydation des cystéines ou sulfonation (trioxydation (C)). Les protéines identifiées par au moins deux peptides, et dont le score Mascot est supérieur au seuil de la requête (p-value <0.01) ont été automatiquement validés en utilisant IRMa (Dupierris et al., 2009).

### III.2.3 - Analyses nanoLC-SRM

L'ensemble des analyses SRM ont pu être réalisées grâce à un libre accès au QTRAP 4000 et à la formation dispensée par Michel Jaquinod.

Les peptides tryptiques extraits secs sont remis en suspension dans une solution d'acétonitrile 4 % et d'acide tri-fluoro-acétique 0,5 % extemporanément à l'injection. Les analyses SRM sont réalisées sur un Q-Trap 4000 (hybrid triple quadrupole/linear ion trap mass spectrometer ABSciex, Foster city, CA) équipé d'une source electrospray de type Nano II.

L'instrument est couplé à un système de chromatographie liquide de type nanoLC (Ultimate 3000, Dionex, Voisins Le Bretonneux, France). La méthode de chromatographie liquide sur la nanoLC consiste en un gradient de 60 minutes allant de 10 % d'acétonitrile à 40 % avec 0,1% d'acide formique pendant 40 min puis de 40 % à 90% en 10 min à un débit de 300 nL.min<sup>-1</sup>. L'échantillon de 6 µL est injecté sur une précolonne PepMap µC<sub>18</sub> (300 µm x 5 mm, Dionex) puis séparé en fonction de l'hydrophobicité des peptides sur colonne C<sub>18</sub> (75 µm x 150 mm, PepMap C18, LC Packings, Dionex). Le spectromètre de masse est calibré en MS/MS et en SRM sur les ions générés par la fragmentation du Glu-fibrinopeptide B. Les données sont acquises en mode positif avec une tension sur l'aiguille de 2200V, le gaz rideau à 20 psi, le gaz nébuliseur à 12 psi et l'interface chauffante à 150 °C. L'énergie de collision (CE), le potentiel de dissociation (DP) et la sortie de la cellule de collision (CXP) sont définies pour une visualisation maximale des transitions SRM et une similarité d'analyse pour chaque paire de peptides légers (L, light) et lourds (H, heavy) dans une gamme de masse de 400 à 1250 m/z. Au moins 3 transitions par peptides sont suivies pour chaque protéine et acquis à une résolution unitaire sur le Q1 et le Q3 identique avec un temps d'accumulation (dwell time) de 50 ms. Les transitions SRM ont été choisis en fonction de l'abondance relative des peptides dans l'analyse complète des spectres MS / MS des protéines cibles et selon les règles de la protéotypicité (Lange et al., 2008).

Les données ont été acquises en utilisant Analyst (version 1.5.1, Applied Biosystems / MDS Sciex) et traitées en mode semi-automatique à l'aide du logiciel MultiQuant (version 1.1, Applied Biosystems / MDS Sciex). Les aires des pics marquées (H, heavy) et non marquées (L, light) ont été calculés pour chaque transition SRM après une vérification minutieuse des profils de coélution. Les ratios (H/L) obtenus à partir des différentes transitions SRM sont moyennés pour calculer le ratio de chaque peptide. Les rapports obtenus pour les différents peptides protéotypiques ont été combinés pour calculer le ratio protéique. Ce ratio déterminé pour chaque protéine permet d'évaluer leur profil de réponse au stress ou phénomène biologique étudié.

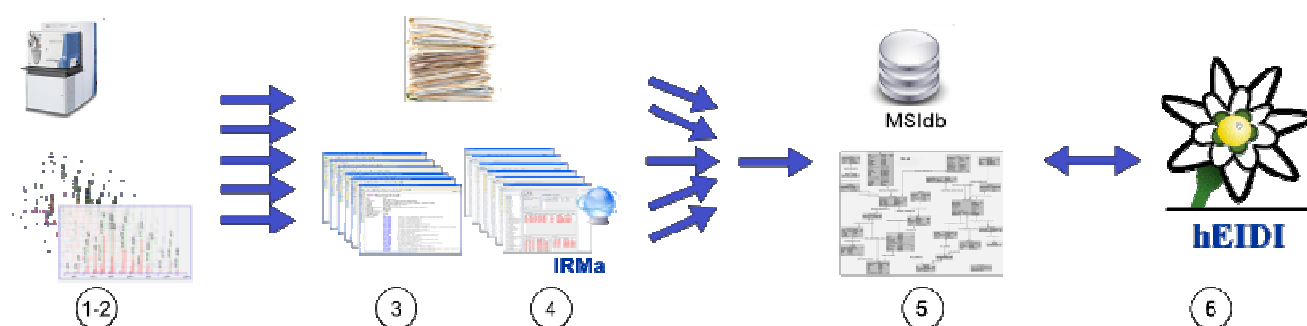
### III.3 - Gestion et fouille des données protéomiques

#### III.3.1 - Les bases de données MSIdb

##### III.3.1.1 - Introduction aux MSIdb

Les MSIdb (5) pour Mass Spectrometry Identification database sont des modèles de bases de données dédiées aux protéines identifiées par Spectrométrie de masse (1-2). Elles contiennent les identifications validées (3) ainsi que toutes les données relatives au pipeline d'analyse.

Les MSIdb sont peuplées en utilisant l'application IRMa (4) et peuvent ensuite être exploitées à l'aide de logiciels d'exploration de bases de données tels que hEIDI (6) ((h) Exploitation et Intégration des Données d'Identification) développé au laboratoire EDyP par l'équipe informatique (Figure 35).



**Figure 35 : Pipeline d'analyse et de gestion des données de spectrométrie de masse.** Numérotation cf. texte ci-dessus.

##### III.3.1.2 - MSIdb dans le cadre du projet « Vacuole »

Plusieurs bases de données, de type MSIdb, ont été créées dans le cadre de mon projet de thèse :

- une base dédiée aux identifications du suc vacuolaire, **Vacuole\_Soluble**
- une dédiée aux identifications des protéines du tonoplaste, **Vacuole\_Membrane**
- une dédiée aux expériences de « shave and conquer », **Vacuole\_SC**.

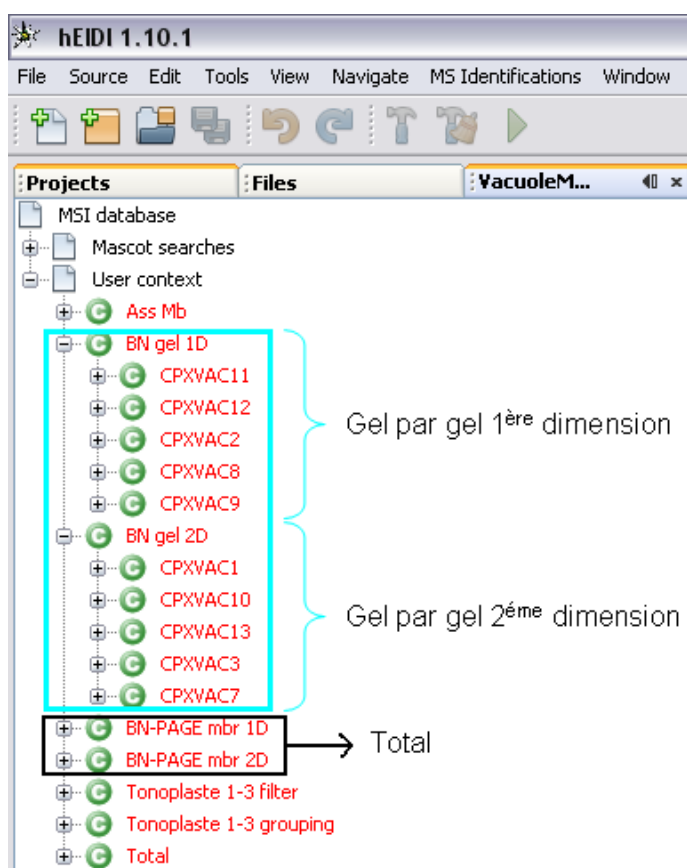
Ces bases sont structurées selon le modèle architecturale de type E1 (Figure 38, cf. p132) et sont compatibles avec la version hEIDI 1.10.



### III.3.1.3 - Utilisation hEIDI

#### a) Les contextes

L'application hEIDI permet de consulter et d'exploiter les données de protéomique. Les résultats d'identification de Mascot validés par iRMA y sont compilés et organisés. La base de données contient l'ensemble des résultats d'identification de Mascot sous forme d'entrée individuelle automatique dans le fichier « mascot searches ». Les résultats d'identification Mascot peuvent être copiés et réorganisés sous forme de contextes définis par l'utilisateur dans le fichier « user context ». Le contexte est une notion centrale dans la gestion des données sous hEIDI, puisque qu'il permet un regroupement des identifications à façon. Les algorithmes développés dans hEIDI vont pouvoir être appliqués aux contextes créés par l'utilisateur. Ainsi l'ensemble des protéines identifiées par un ensemble de peptides sont associées en « protein group ». hEIDI permet de regrouper, de consolider les identifications et d'éliminer la redondance. Pour illustrer ce concept de contexte prenons l'exemple de la base Vacuole\_Membrane :



La Figure 36 illustre l'affichage caractéristique du « user context » ouvert contenant les différents contextes que j'ai créé dans la base Vacuole\_membrane.

Les différentes identifications mascot des expériences de Blue Native PAGE sont regroupées soit par expériences CPXVACn soit par type BN gel 1D pour 1ère dimension ...

**Figure 36 : Copie d'écran de l'application hEIDI illustrant les « user context »**

### b) Requêtes SQL

Les MSIdb reposent sur une infrastructure codée en PostgreSQL, il est donc possible d'interroger la base pour la consulter sous forme de requêtes en langage SQL. Pour cela il est indispensable d'avoir sous les yeux le plan qui schématise l'organisation des tables de la base de données (Figure 38, cf. p133).

#### III.3.1.4 - Le grouping et la comparaison dans hEIDI

Un 'protein group' (similaire à la notion de Mascot® protein hit) est un ensemble de protéines identifiées par un ensemble de peptides. Un 'protein group' contient non seulement toutes les protéines couvertes par le même ensemble de peptides, mais aussi toutes les protéines couvertes par un sous-ensemble de ces peptides. Il est représenté par une master ou typical protein (protéine maître ou typique). En détaillant un 'protein group' selon son contenu on peut définir : l'ensemble des peptides identifiées pour la 'master protein', l'ensemble des protéines ayant la même collection de peptides (sameset) et l'ensemble des protéines identifiées par un sous-ensemble de peptides contenus dans la collection (subset). Dans hEIDI, le grouping est exécuté par l'algorithme de regroupement des protéines sur un contexte donné auquel on définit une tolérance, dans mon cas de 0.0010 ppm sur la masse. Une fois le grouping effectué les n contextes sont comparés, le but est de rechercher la similarité au sein des 'protein group', à savoir si ces 'protein group' sont identifiés avec le même ensemble de protéines et par un même ensemble de peptides.

La mesure de similarité (s) est basée sur le calcul du coefficient de Dice dont le résultat donne des valeurs comprises entre 0 et 1, avec X et Y deux ensembles de peptides.

$$s = \frac{2|X \cap Y|}{|X| + |Y|}$$

La liste des 'protein group' des contextes et de leur comparaison sont exportables sous format Excel.

### III.3.2 - Recherche in silico : les bases de données en lignes

Les fichiers Excel qui contiennent les résultats d'identification hEIDI sont annotés par l'utilisateur afin d'en compléter le contenu en informations disponibles dans les bases de données en ligne. Ces informations supplémentaires permettent d'étendre les connaissances sur les protéines identifiées en vue d'une interprétation vers un sens biologique factuel. J'ai ainsi créé un tableau nommé « Protéothèque vacuole » qui regroupe les identifications des protéines

vacuolaires obtenues pendant cette thèse. Tel une bibliothèque de protéines ou un catalogue vacuolaire se veut le plus exhaustif possible, il contient donc les références de différentes bases de données en accès public sur le net.

### III.3.2.1 - Les bases de données en ligne généraliste

**Uniprot:** <http://www.uniprot.org/>

The Universal Protein Resource (Uniprot) met à disposition de la communauté scientifique une ressource complète, de haute qualité et librement accessible de la séquence des protéines ainsi que des informations fonctionnelles. UniProt est issu d'une collaboration entre l'European Bioinformatics Institute (EBI), le Swiss Institute of Bioinformatics (SIB) et le Protein Information Resource (PIR).

**Tair:** <http://www.arabidopsis.org/>

The Arabidopsis Information Resource (Tair) fournit une base de données de génétique et de biologie moléculaire de la plante supérieure modèle *Arabidopsis thaliana*. Les données disponibles à partir de TAIR comprennent la séquence complète du génome, la structure des gènes, des cartes du génome, l'expression des gènes, l'ADN, les marqueurs génétiques et physiques, des informations du produit des gènes, le métabolisme, les stocks de semences, les publications et des informations sur la communauté scientifique qui travail sur *Arabidopsis thaliana*. Tair est développé et maintenue par le Carnegie, Institution for Science, Department of Plant Biology à Stanford en Californie.

**SUBA II:** <http://suba.plantenergy.uwa.edu.au/>

The SubCellular Proteomic Database II (SUBA II) rassemble des milliers d'information provenant d'une collection à la fois expérimentale (données protéomique et localisation GFP) et prédite (prédictions bioinformatiques) de localisations subcellulaires des protéines d'*Arabidopsis thaliana*. Cette base de données fournit, en accès Web, un outil dynamique de construction de requête qui permet de rechercher ces informations. SUBA est issue d'une collaboration entre Plant Energy Biology (ARC center of Excellence, Australia) et le Computational Systems Biology (Centre of Excellence at The University of Western Australia).

**Aramemnon:** <http://aramemnon.botanik.uni-koeln.de/>

The Arabidopsis plant membrane proteins database (ARAMEMNON) est une base de données sur la plante modèle de référence *Arabidopsis thaliana*. À l'origine elle contenait uniquement les protéines membranaires, mais désormais la version Aramemnon 7.0 recense toutes les protéines d'*Arabidopsis thaliana* ainsi que celles de 5 autres plantes modèles.

Les données disponibles sur Aramemnon sont :

- la description des protéines (manuellement organisée et régulièrement mise à jour à partir de références bibliographiques)
- les données de séquençage (ADN, séquence génomique et la prédiction des exons)
- les prévisions de protéines et de leurs domaines conservés (issu de la DB PFAM)
- les prévisions de topologie des protéines (domaines transmembranaires, modifications post-traductionnelles lipidique, localisation subcellulaire)
- les relations entre protéines homologues (clusters d'orthologues et cladogrammes de séquences homologues).

Aramemnon est un projet allemand du Flügge Lab, Botanical Institute at the University of Cologne en collaboration avec l'équipe du GabiPD au Max Planck Institut of Molecular Plant Physiology (MPIMPP) de Potsdam pour les calculs exigeant plus de puissance de traitement.

**PPDB:** <http://ppdb.tc.cornell.edu/>

The Plant Proteome DataBase (PPDB) était initialement consacrée aux plastes végétaux, mais s'est maintenant étendue aux protéomes de la plante entière en quittant son ancien nom de baptême l'APB en Novembre 2007. Les données disponibles sur PPDB sont : des données expérimentales de protéomique obtenue en interne (van Wijk Lab), des informations sur les résultats de l'analyse par spectrométrie de masse, des informations sur la fonction et les propriétés des protéines, et la localisation subcellulaire des protéines. Mais PPDB regroupe également des informations issues de Tair, DFCI Gene Index, PFAM, MapMan system.

PPDB est un projet du Klaas J. van Wijk Lab du Departement of Plant Biology, Cornell University dans l'état de New York.

### III.3.2.2 - Les bases de données en ligne spécifique des classes de protéines

#### a) *Classification fonctionnelle*

**MapMan system:** <http://mapman.gabipd.org/web/guest/home>

MapMan est un outil développé pour les grands ensembles de données transcriptomique tels que les données d'expression génique d'Arabidopsis de type Affymetrix arrays. Le but est d'afficher des schémas de voies métaboliques ou autres voies dans un contexte fonctionnel (Thimm et al., 2004 ; Usadel et al., 2005). MapMan peut être étendu à d'autres systèmes, la classification fonctionnelle développée par le GabiPD du MPIMPP de Golm à été reprise sous le format MapManBin dans PPDB.

#### b) *Classification en famille*

**SUPERFAMILY:** <http://supfam.org/SUPERFAMILY/index.html>

Superfamily est une base de données qui fournit l'annotation structurale et fonctionnelle des séquences de protéines de plus de 1400 génomes complètement séquencés. L'annotation dans superfamily se base sur les familles SCOP (Structural Classification Of Proteins) en utilisant le principe des modèles de Markov cachés.

#### c) *Classification des enzymes*

**IntEnz:** <http://www.ebi.ac.uk/intenz/>

**Integrated relational Enzyme database (IntEnz)** est une ressource qui traite de la nomenclature des enzymes. IntEnz contient les recommandations du Comité de la nomenclature de l'Union internationale de biochimie et de biologie moléculaire (NC-IUBMB) relatif à la nomenclature et la classification des réactions catalysées par des enzymes. IntEnz est créé en collaboration entre Institut européen de bioinformatique (EBI) et l'Institut Suisse de Bioinformatique (SIB). Cette collaboration a ensuite donné naissance à la production de la base ENZYME.

**ENZYME:** <http://www.expasy.org/enzyme/>

The Enzyme Data Bank (ENZYME) décrit chaque type d'enzymes caractérisées pour lesquels un EC (Enzyme Commission) number a été fourni.

**KEGG:** <http://www.genome.jp/kegg/>

Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) est une ressource bioinformatique dont le défi est de fournir une représentation complète des processus cellulaires et du fonctionnement des organismes et écosystèmes aux niveaux génomique et moléculaire. KEGG est une initiative du Kanehisa Laboratories in the Bioinformatics Center of Kyoto University et de the Human Genome Center of the University of Tokyo au Japon.

Afin d'interroger la base KEGG avec des numéros d'accès au format ATG (Tair) il existe un outil de recherche nommé DBGET Search (GenomeNet Database Resources - Integrated Database Retrieval System) <http://www.genome.jp/dbget-bin/>

*d) Classification des peptidases*

**MEROPS:** <http://merops.sanger.ac.uk/>

Merops la base de données des peptidases, également appelées protéases, protéinases ou enzymes protéolytiques, décrit la classification et la nomenclature des peptidases et des protéines qui les inhibent. Des informations telles que la séquence, la structure si elle est connue, la littérature et plus sont disponibles pour *Arabidopsis thaliana* ainsi que d'autres modèles. Merops est développé par Neil D. Rawlings et Alan J. Barrett at the Wellcome Trust Sanger Institute, Cambridge en Angleterre.

*e) Classification des glycosidases*

**CAZy:** <http://www.cazy.org/>

The Carbohydrate-Active enZYmes database (CAZy) décrit les enzymes qui dégradent, modifient ou créent des liaisons glycosidiques. CAZy tente de couvrir toutes les protéines à glyco-domaine à l'échelle des organismes et des glycosciences. Dès que de nouveaux génomes sont ajoutés dans GenBank, de nouvelles familles sont créées et la base est mise à jour. Les 5 grandes classes décrites sont les protéines à domaine de liaisons carbohydrates (CBMs), les GlycosylTransferases (GTs), les Polysaccharide lyases (PLs), les Carbohydrate Esterase (CEs) et glycoside hydrolases (GHs). Ces dernières étant celles qui nous intéressent le plus dans le cas de la description des protéines vacuolaires.

f) *Classification des transporteurs*

**TCDB:** <http://www.tcdb.org/>

The Transporter Classification DataBase (TCDB) fournit une classification fonctionnelle de plus de 600 familles de transporteurs membranaires et de leur phylogénie approuvée par IUBMB. Le système TC number est analogue au système EC number de la classification des enzymes, sauf qu'il intègre à la fois des informations fonctionnelles et phylogénétiques.

Le système TC est basé sur cinq critères, et chacun de ces critères correspond à l'un des cinq chiffres ou lettres au sein du TC number # pour un type particulier de transporteur. (Saier *et al.*, 2006 and 2009)

### III.3.3 - Les tableaux d'identification des protéines

Afin de compiler au mieux les informations issues des différentes bases de données en ligne, j'ai utilisé des fonctions du type Vlookup et des macros VBA (langage Visual Basic) dans Excel (créée ou inspirée de celles créées par Marianne Tardif, membre du laboratoire EDyP).

#### III.3.3.1 - Procédure pour concevoir les tableaux :

- 1- À partir de la liste des accessions ATG issue du grouping hEIDI qui contient les descriptions de Tair puis les résultats de spectrométrie de masse (colonnes 15 à 22), création d'un tableau à 23 colonnes (
- 2- Figure 37)
- 3- Dans Uniprot mapping des ID Tair vs ID Uniprot
- 4- Customisation des données à rechercher dans Uniprot grâce à la fonction 'Custom'
- 5- Extraction des données Uniprot grâce à la fonction 'Retrieve data'
- 6- Export des données Uniprot
- 7- Retrait des doublons grâce à une macro VBA
- 8- Extraction des données (Description, Mapped PubMed ID, certains EC number) issu de l'export Uniprot par la fonction Vlookup dans la table initiale qui contient la liste des ATG
- 9- Recherche et export des données PPDB
- 10- Extraction Vlook up dans la table initiale 'liste d'ATG' des infos PPDB (Description, Famille, MapManBin, Gravy index)
- 11- Insertion des liens vers Tair, Suba et Aramemnon à l'aide d'une macro VBA

- 12- Annotation manuelle des descriptions et des symboles des protéines à partir des infos Tair, PPDB, Uniprot.
- 13- Annotation manuelle des localisations à partir de Tair, Uniprot, SUBA et Aramemnon
- 14- Annotation manuelle des familles et super familles de protéines à partir de Tair, Aramemnon, Superfamily, Pfam
- 15- Annotation manuelle des domaines membranaires à partir d'Aramemnon
- 16- Annotation manuelle des EC numbers à partir de KEGG et IntEnz
- 17- Normalisation des annotations au sein des familles de protéines tels que les VATPase, les glycosidases, les protéases...

1 Accession Protein		2 Symbols		3 Protein Description		4 Family Protein		5 Superfamily Protein		6 Localization		7 MapManBin	
8 EC numbers		9 Mb Association			10 Gravy index		11 Link TAIR		12 Link Aramemnon			13 Link SUBA	
14 length	15 mass	16 pI	17 #pep.	18 score	19 coverage	20 Spectral Count		21 SpC / ΣSpC		22 SpC / MW *10 <sup>9</sup>		23 Mapped PubMed ID	

Figure 37 : Item du tableau Protéothèque vacuole



### III.3.4 - Les outils informatiques

#### III.3.4.1 - Pour traiter les données $^{15}\text{N}$

##### **RMI & Mime**

RMI & Mime sont des outils complémentaires d'analyse de la trace MS développés au laboratoire EDyP par l'équipe informatique. RMI pour Recherche de Massifs Isotopiques est basé sur la correspondance d'un modèle théorique de massifs isotopiques avec les données expérimentales. La distribution isotopique attendue est calculée en fonction de la masse supposée du peptide. Ce calcul est basé sur un acide aminé moyen dont la composition atomique est la composition moyenne des AA naturels, compte tenu de leur fréquence d'apparition dans les banques protéiques. Il est donc nécessaire de fournir au software une indication du décalage de masse (+1, +2, ... +9) entre un massif isotopique d'abondance naturelle et un massif isotopique marqué. Mime pour Marquage isotopique et mesure d'expression permet l'appariement et la quantification des massifs.

**Viper & Decon2LS :** <http://omics.pnl.gov/software/VIPER.php> et [/Decon2LS.php](http://omics.pnl.gov/software/Decon2LS.php)

Viper & Decon2LS sont des outils complémentaires d'analyse et de quantification de la trace MS qui se télécharge gratuitement depuis le site du PNNL. Ils sont principalement destinés aux traitements des données d'instruments de masse à haute précision de mesure (par exemple, FT, TOF, ou Orbitrap).

Decon2LS est un logiciel utilisé pour la détection des données MS, le principe de base est la déconvolution des massifs isotopiques. Cette outil détecte tous les massifs isotopiques présents puis les ordonne en définissant le début du massif par le pic le plus intense, enfin réalise une auto-corrélation entre les massifs « N14/N15 ». Au cours du processus, on peut distinguer différentes étapes de: réduction du bruit, détection de crête, prédiction du massif isotopique théorique et une fonction qui quantifie la qualité de la signature observée.

VIPER (Visual Inspection of Peak / Elution Relationships) peut être utilisé pour visualiser et caractériser les éléments détectés par Decon2LS en analyses LC-MS.

**Isopro:** <http://ionsource.com/links/programs.htm>

Isopro est distribué sur Ionsource, et produite par The International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC). IsoPro peut effectuer des calculs de masse et des simulations de massifs isotopiques. Il se présente comme un tableau périodique à partir duquel on peut changer les proportions relatives des différentes formes isotopiques d'un ou plusieurs éléments chimiques.

**MFPaQ** : <http://mfpaq.sourceforge.net/v3/>

MFPaQ (Mascot File Parsing and Quantification) est un logiciel open source développé à l'IPBS (Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale, Toulouse, France) par la plateforme de protéomique (Bouyssié *et al.*, 2007). Il est dédié à l'analyse, la validation et la quantification des données de protéomique.

**Mascot Distiller** : <http://www.matrixscience.com/distiller.html>

Mascot Distiller est un logiciel adduit de l'interface mascot® (cf. annexe 1) et de mascot daemon® (interface d'interrogation des données d'identification par groupes). Il permet la détection des pics et la quantification des données. Il combine à fois les données quantifiées en MS et les données d'identification MS/MS.

#### III.3.4.2 - Pour construire les méthodes SRM et analyser les résultats

**mMass**: <http://mmass.biographics.cz/>

mMass est un outil de spectrométrie de masse Open Source développé par Martin Strohal, de l'Institute of Chemical Technology, Prague Department of Biochemistry and Microbiology. mMass permet de calculer des modèles théoriques de données de protéomique.

**ESP Predictor:**

<http://www.broadinstitute.org/cancer/software/genepattern/modules/ESPPredictor.html>

ESP Predictor est un modèle informatique permettant de prédire la probabilité qu'un peptide à partir d'une protéine donnée va générer une réponse élevée dans une expérience ESI-MS en utilisant un algorithme de classification de type Random Forest (méthode statistique de classification). 550 propriétés physico-chimiques ont été sélectionnées afin de caractériser les peptides dont la masse, la longueur, la charge, l'hydrophobicité, la basicité en phase gazeuse, le pI ...

**MultiQuant™**: <http://www.absciex.com/Products/Software/MultiQuant-Software>

MutiQuant™ est un logiciel développé par ABSciex. Il est dédié à l'analyse, la validation et la quantification des données de SRM.

#### III.3.4.3 - Pour les diagrammes de Venn

**Venny:** <http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/venny.php>

Venny est un outil interactif disponible gratuitement en ligne qui permet la comparaison de listes sous forme de diagramme de Venn jusqu'à 4 cercles. (Oliveros *et al.*, 2007)

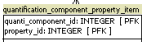
**VennDiagramPlotter:** <http://omics.pnl.gov/software/VennDiagramPlotter.php>

VennDiagramPlotter est un outil qui se télécharge gratuitement depuis le site du PNNL. Ce programme conçoit des diagrammes de Venn à 2 et 3 cercles proportionnellement dimensionnés et positionnés.

#### III.3.4.4 - Pour la bibliographie

**Bibus:** <http://sourceforge.net/projects/bibus-biblio/>

Bibus est un outil de gestion de références et de données bibliographiques. Bibus permet de chercher, d'éditer et d'organiser les références bibliographiques.



# Chapitre I : Analyse protéique de la fraction soluble vacuolaire d'*Arabidopsis thaliana*

Nous nous intéresserons dans ce chapitre à la caractérisation du protéome soluble de la vacuole. L'aspect de la protéomique vacuolaire (fraction soluble) est moins détaillé dans la littérature que l'analyse des protéines tonoplastiques, probablement du fait des difficultés à obtenir des organites intacts et des possibles contaminations (Pflieger & Rossier 2008 ; Agrawal, Jwa, *et al.*, 2010). Ces contaminations s'expliquent de par le rôle de la vacuole dans l'hydrolyse des constituants cellulaires en vue de leur dégradation et / ou recyclage (Canut *et al.*, 1985).

## **I - Introduction**

Pour appréhender les fonctions du protéome vacuolaire d'*Arabidopsis thaliana*, une stratégie d'analyse basée sur le fractionnement de l'échantillon et son analyse par spectrométrie de masse a été mise en place (Figure 39). Plusieurs approches méthodologiques sont concernées : SDS-PAGE, Blue Native PAGE, IEF/SDS-PAGE, LC-MS/MS. L'article présenté dans les pages consécutives à ce chapeau décrit les résultats suivants:

### **(i) l'analyse et l'identification des protéines solubles**

Pour leur identification par spectrométrie de masse, les protéines contenues dans la phase soluble ont été soumises à une courte électrophorèse, puis la piste de migration divisée en 15 parties. La digestion trypsique de chaque bande a été réalisée *in gel*, et les peptides résultants analysés sur une chaîne nano-LC Orbitrap (colonne chromatographique nanométrique suivie d'un spectromètre de masse à haut pouvoir de résolution de masse). Le fractionnement de l'échantillon sur gel d'électrophorèse classique (SDS-PAGE) puis l'élution séquentielle des peptides tryptiques (LC) vers le spectromètre de masse ont permis d'identifier une liste de 504 protéines vacuolaires (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.** - Protéothèque). Pour la première fois, les protéines majeures solubles de la vacuole d'*Arabidopsis thaliana* ont pu être recensées.

Les protéines identifiées ont été réparties en 7 catégories fonctionnelles, sur la base des informations extraites dans les bases ARAMEMNON (Arabidopsis plant membrane proteins database) et SUBA II (SubCellular Proteomic Database II) et de la classification proposée par le MapMan system (cf. Math & Méth). Les catégories définies sont les enzymes, les transporteurs, les protéines impliquées dans la signalisation ou la régulation de l'expression protéique, les protéines de classification inconnue, le trafic vésiculaire, l'organisation cellulaire. Les deux dernières catégories ne sont pas représentées ici mais nous en discuterons plus loin concernant la fraction membranaire. On peut donc définir 5 grandes catégories fonctionnelles de protéines pour expliciter la composition du protéome soluble vacuolaire.

Les enzymes représentent 73 % des protéines identifiées soit 385 protéines. Le détail de la classification des enzymes est basé sur les recommandations prescrites par le NC-IUBMB (cf. Annexe 2). Les hydrolases, impliquées dans les processus de dégradation et de recyclage des composés cellulaires, représentent plus des deux tiers des protéines identifiées, et se répartissent entre protéases, glycosidases, lipases et nucléases. Les glycosidases et les protéases sont majoritaires parmi les hydrolases caractérisées dans nos échantillons, elles ont donc été extraites de la classification hydrolases pour figurer comme des classes à part entière.

Le métabolisme primaire (glycolyse, cycle des acides tricarboxyliques et synthèse des acides aminés) est relativement présent puisque 107 enzymes impliquées dans les voies métaboliques primaires ont été retrouvées dans les analyses effectuées. Certaines enzymes impliquées dans le métabolisme secondaire (11 synthèses d'alcaloïdes, 25 maintenance de la paroi cellulaire ...) sont également représentées.

D'autres fonctions cellulaires majeures telles que la réponse au stress / défense contre les pathogènes constituent une part importante des protéines identifiées *via* la présence de nombreuses oxidoreductases (17 % des enzymes), des inhibiteurs de protéases (2 inhibiteurs de la famille des Kunitz, une serpine et une phytocystatine) ou des peptidases (19 % des enzymes) (Tableau I en annexes). La signalisation cellulaire représente également une part intéressante des protéines identifiées (6 % du protéome) parmi lesquelles des protéines possédant des motifs de liaisons au calcium (Ca) (2 calcium binding protéines : Atg51570 et At3g57880 et la Calreticulin 1) par exemple, mais aussi des indicateurs comme une lipocalin (At5g58070) induite par changement thermique, sûrement une conséquence du protocole de purification.

Les activités de transport et de stockage, mises en évidence dans le protéome membranaire à travers la présence de 110 transporteurs (Jaquinod *et al.*, 2007), sont logiquement moins représentées dans le protéome soluble où elles ne concernent que 11 % des identifications (protéines de liaison aux métaux : ferritines, protéine de liaison au Zn, Ca ... et quelques transporteurs majoritaires facilitant les échanges avec le cytosol : aquaporines ou TIP). De petits fragments de tonoplaste peuvent être co-fractionnés avec le soluble ce qui expliquerait l'identification des TIP, très abondantes au niveau des vacuoles. Certains des transporteurs identifiés comme la V-ATPase, possèdent des sous-unités solubles (sous-unités V1) qui sont emportées avec la fraction soluble lors du protocole de purification.

Enfin, 36 protéines (soit 9 % du protéome soluble) n'ont pas été classées. Une part d'entre elles (21 protéines) correspond aux gènes annotés « expressed protein », qui n'ont ni fonction ni motif structuraux connus à ce jour. D'autres possèdent des domaines particuliers (liaison aux lipides ou aux acides nucléiques par exemple) ou un profil d'expression connu (réponse à l'auxine, thaumatococines) mais n'ont pas de fonction identifiée.

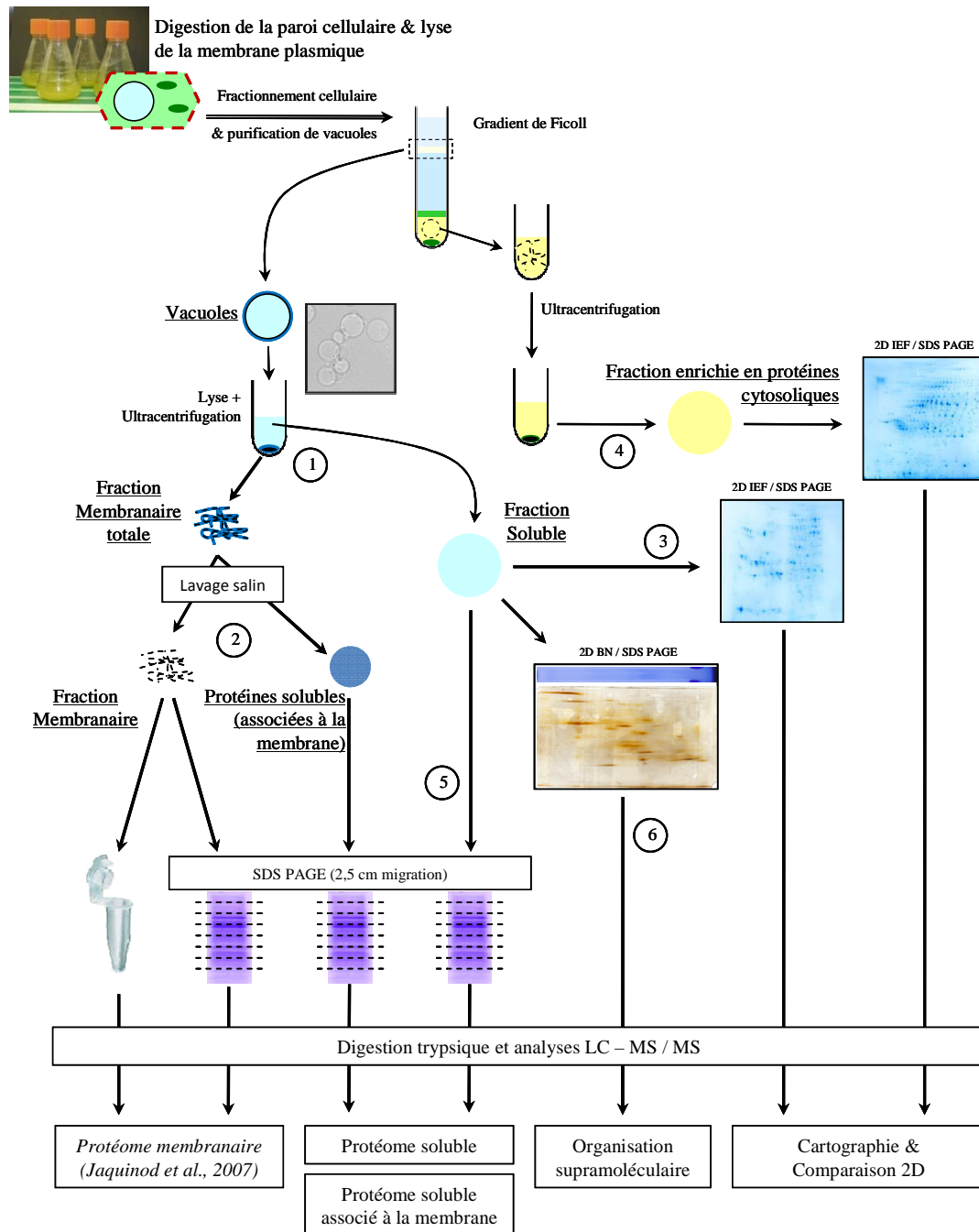
**(ii) la cartographie du protéome soluble de la vacuole** via la réalisation de gels d'électrophorèses bidimensionnelles (IEF/SDS-PAGE) suivi de l'identification des protéines par LC-MS/MS (Qtof). Cette méthode a été mise en place en première approche avec deux objectifs : un aspect quantitatif par analyse colorimétrique des spots et un aspect comparatif puisque le même type de cartographie a été réalisé sur des échantillons de cytosol des cellules d'*Arabidopsis thaliana*. A notre connaissance, aucune analyse par spectrométrie de masse des protéines du cytosol ayant été réalisée à ce jour, nous avons initié une caractérisation protéomique de la fraction cytosolique de cellules en culture d'*Arabidopsis thaliana*, destinée à identifier les protéines majeures de ce compartiment.

**(iii) L'analyse « shave and conquer » de la fraction soluble des échantillons de vacuoles** (traitées ou non à la protéinase K) a conduit à une identification de protéines plus faible que (i). Cette analyse, moins exhaustive que celle réalisée précédemment, a été faite de manière à mettre en évidence la « disparition » ou l'enrichissement de protéines suite à l'incubation des organites intacts avec la protéase. Cette étude de protection à la protéinase K réalisée en triplicata sur des séries de préparations de vacuoles (une série = trois préparations groupées à chaque fois) permet d'ores et déjà de mettre en évidence quelques aspects de l'organisation des protéines dans, ou associées à, la vacuole.

**(iv) l'analyse de la composition supramoléculaire des protéines solubles vacuolaires via l'utilisation de gels bidimensionnels (Blue Native/SDS-PAGE –gels natifs).** Publiée pour la première fois en 1991, la technique du *Blue-Native PolyAcrylamide Gel Electrophoresis* (BN-PAGE) a permis de séparer et de caractériser les différents complexes de la chaîne respiratoire de la mitochondrie sans en dissocier les sous-unités (Schagger & von Jagow, 1991). Depuis, cette technique a été également utilisée pour isoler les complexes du chloroplaste (Neff & Dencher, 1999 ; Heinemeyer *et al.*, 2004) et de la mitochondrie végétale (Jansch *et al.*, 1996 ; Heazlewood *et al.*, 2003), mais n'a jamais été appliquée à l'analyse du protéome vacuolaire, ni de plante ni de levure. Les gels d'électrophorèse de type BN-PAGE présentent le profil électrophorétique en conditions non dénaturantes de la fraction soluble de la vacuole. La comparaison de ces électrophorèses montre que, si la résolution est variable d'une expérience à l'autre, le profil protéique reste quant à lui constant, la plupart des spots étant présents sur l'ensemble des gels réalisés. Cette méthode nous a permis de mettre en évidence un certain nombre de complexes putatifs, probablement impliqués dans des fonctions vacuolaires majeures.

Mon implication personnelle porte sur l'ensemble des résultats de protéomique en termes d'analyse et de fouille des données. Mon travail a consisté en la préparation du matériel biologique utilisé pour ces analyses, ainsi que le traitement pré-analytique des échantillons. J'ai été l'instigatrice de la conception, la mise au point des expériences de « shave and conquer » ainsi que l'obtention des résultats.





**Figure 39 : Schéma de l'approche globale mise en place pour permettre une analyse approfondie du protéome vacuolaire d'*Arabidopsis thaliana* :** Après purification et fractionnement des vacuoles, les extraits soluble et membranaire sont analysés séparément (1). L'étude réalisée sur la fraction membranaire comporte deux axes, une identification des protéines membranaires en solution (méthanol) et une analyse après courte migration par électrophorèse de type SDS-PAGE (résultats publiés par Jaquinod et al., 2007) (2). Suite au fractionnement cellulaire, le protéome soluble est isolé pour effectuer des gels d'électrophorèses bidimensionnels (2D IEF/SDS-PAGE) afin d'établir une cartographie de ce protéome (3). Cette cartographie sera comparée à celle réalisée avec le protéome cytosolique (4). L'identification des protéines de la fraction soluble vacuolaire fractionnée au préalable par une courte migration sur gel d'électrophorèse de type SDS-PAGE, a également été effectuée (5). L'étude de la composition supramoléculaires des protéines solubles vacuolaires a été menée *via* la réalisation de Blue Native gel (BN-PAGE) (6).

## ***II - Résultats - Discussion***

### **An unexpected metabolic and signalling network linking the vacuole and the cytosol of *Arabidopsis thaliana* revealed by proteomic dissection**

Running title: Proteomic dissection of the *Ath* soluble vacuolar proteome

Florent Villiers<sup>1,2,3,4\*</sup>, Nolwenn Jarno<sup>1,2,3,4,5,6\*</sup>, Michel Jaquinod<sup>2,5,6</sup>, Lauriane Kuhn<sup>2,5,6</sup>, Mathieu Nicaise<sup>1,2,3,4</sup>, Agnès Jourdain<sup>1,2,3,4</sup>, Sylvie Luche<sup>2,8,9</sup>, Christophe Bruley<sup>2,5,6</sup>, Thierry Rabilloud<sup>2,8,9</sup>, Jérôme Garin<sup>2,5,6</sup> and Jacques Bourguignon<sup>1,2,3,4</sup>

<sup>1</sup>CEA (Commissariat à l'Energie Atomique et aux Energies Alternatives), iRTSV, Laboratoire de Physiologie Cellulaire Végétale (LPCV), 17 rue des Martyrs, Grenoble F-38054, France

<sup>2</sup>Université Joseph Fourier (UJF), Grenoble F-38054, France.

<sup>3</sup>CNRS (UMR 5168), LPCV, Grenoble F-38054, France.

<sup>4</sup>INRA (UMR1200), LPCV, Grenoble F-38054, France.

<sup>5</sup>CEA, iRTSV, Laboratoire Biologie à Grande Echelle, F-38054 Grenoble, France.

<sup>6</sup>INSERM, U1038, F-38054 Grenoble, France.

<sup>7</sup>CEA, iRTSV, Laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux (LCBM), 17 rue des martyrs, Grenoble F-38054

<sup>8</sup>CNRS, UMR 5249, LCBM, Grenoble F-38054 Grenoble France

FV was granted from the CEA and NJ from the “Ministère de la Recherche”

Authors to whom correspondence should be addressed: Jacques Bourguignon, LPCV, iRTSV, CEA-Grenoble (e mail : [jacques.bourguignon@cea.fr](mailto:jacques.bourguignon@cea.fr)); Michel jaquinod, LEDyP, iRTSV, CEA-Grenoble (e mail : [mjaquinod@cea.fr](mailto:mjaquinod@cea.fr))

## *Abstract*

---

In order to expand our knowledge on plant vacuoles, we have undertaken a series of proteomic experiments aiming to decipher the protein organization of the soluble compartment of *Arabidopsis thaliana* vacuoles. Shotgun analyses of the vacuolar soluble proteome led to the identification of a total of 504 soluble proteins, which functional categorization evidenced a broad range of cellular functions. This highlighted some activities as highly represented in the vacuolar metabolism, including particularly unexpected ones, such as the 20S proteasome proteolytic pathway including 20S proteasome, tripeptidyl peptidase II, thimet oligopeptidase and leucine aminopeptidase. Next, we used traditional two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis to identify the major soluble vacuolar proteins, and gain insights into quantitative traits of this proteome. These unprecedented two-dimensional maps of the plant vacuolar soluble proteome revealed 152 spots, allowing the identification of 90 proteins by mass spectrometry. Some polypeptides were present in multiple forms, indicating the occurrence of several types of post-translational modifications. In addition to this, functional relationship between vacuole and cytosol were investigated through a comparative approach of major proteins of these compartments. Cartography of the cytosolic proteome by 2D gel revealed 153 different proteins, identified from 200 spots, and this work interestingly supports the existence of a rather complex network of pathways and functions linking these compartments. At last, we decided to further analyse aspects of the supramolecular organization of this proteome by 2D Blue Native / SDS-PAGE. All together, these results suggests that vacuole and cytosol are closely related cell compartments, probably more than ever described in the literature, sharing fundamental metabolic and signaling pathways.

## Introduction

Vacuoles, which can occupy as much as 90% of the total intracellular volume, are essential for plant physiology and metabolism. They contribute to many cellular functions including maintenance of turgor pressure, pH regulation, ion homeostasis, calcium signalling, or degradation of macromolecules (Martinoia *et al.* 2007, Marty 1999). They are also involved in the storage of organic acids and amino acids, carbohydrates, vitamins and co-factors, as well as ions, including potassium, phosphate, nitrate, sulphate; flavonoids such as anthocyanins. In addition, vacuoles are implicated in detoxification processes by sequestering toxic compounds such as heavy metals or xenobiotic molecules (Marty 1999).

The vacuole membrane, or tonoplast, plays an important role in metabolic exchanges between the vacuole and the cytosol and contains transporters involved in the vacuolar uptake and release of nutrients and metabolites essential for maintaining optimal metabolic conditions in the cytosol. Functioning of these transporters requires energy and two vacuolar proton pumps, V-ATPase (VHA) and V-PPase, are responsible for the generation of  $\Delta\text{pH}$  and  $\Delta\Psi$  necessary for the transport of compounds against their concentrations or electrochemical potential gradients (Drozdowicz and Rea 2001, Kluge *et al.* 2003, Maeshima 2001, Sze *et al.* 1999). Other classes of transporters such as the P-type ATPases and ATP-binding cassette (ABC) transporters function without the necessity of the proton motive force (Martinoia *et al.* 2007, Neuhaus 2007, Rea 2007). The number of vacuolar transporters that have been functionally characterized and identified at the gene level is quite limited and several tonoplast-localized transport activities remain uncharacterized at the molecular level (Martinoia *et al.* 2007). In order to increase our knowledge of the vacuolar protein composition and to build the basis for future functional studies, proteomic analyses have been carried out on vacuoles from several plant species including *Arabidopsis* (Carter *et al.* 2004, Jaquinod *et al.* 2007, Sazuka *et al.* 2004, Shimaoka *et al.* 2004), barley (Endler *et al.* 2006) and cauliflower (Schmidt *et al.* 2007). All these studies (with the exception of Carter *et al.*, 2004) focused on the characterization of the tonoplast proteome and led to the identification of new and well-known tonoplast transporters. Proteomic approaches were also employed to analyse expression fluctuation of vacuolar membrane proteins and allowed the identification of differentially expressed proteins in response to environmental changes such as salt stress (Barkla *et al.* 2009) or cadmium stress (Schneider *et al.* 2009). The activity of the vacuolar transporters in many cases has to be rapidly controlled and could be tightly regulated by post-translational modifications as shown for plasma membrane aquaporins (Prak *et al.* 2008). In order to elucidate mechanistic regulation by phosphorylation of the vacuolar proton pumps,

channels or other transporters, post-translational analyses of the tonoplast proteome were performed and identified several phosphorylation sites in several transporters including proton pumps, aquaporins, CAX and ABC transporters (Endler *et al.* 2009, Whiteman *et al.* 2008a, Whiteman *et al.* 2008b).

As mentioned, the essential of the proteomic vacuolar work was performed on the tonoplast fraction and only one work analyzed the soluble proteome. In our previous study, we isolated vacuoles from *Arabidopsis* suspension cells, immunological assays were used to examine cross contaminations by other organelles including mitochondrion, plastid, endoplasmic reticulum and plasma membrane, and enzymatic assays based on the specific activity of the vacuolar marker  $\alpha$ -mannosidase were also performed to evaluate the enrichment factor (Jaquinod *et al.* 2007). The high purity of the vacuole preparations allowed for a proteomic investigation of the tonoplast proteins and 416 proteins, including 110 transporters, were identified from the membrane fraction, whereof 195 were considered integral membrane proteins based on the presence of one or more predicted transmembrane domain(s). In the present work, we focus our study on the soluble counterpart of the vacuoles. Two different procedures were used to analyze the soluble vacuolar proteome that lead to the identification of 504 proteins, in absence of salts and 373, in presence of salts. We present the first 2D map of a plant vacuolar proteome and identified by nanoLC-MS/MS, ninety major vacuolar proteins. Because of the presence of some cytosolic proteins in the vacuole proteome, we also analyzed the proteome of the cytosol which is poorly documented. A comprehensive cartography of this proteome by 2D gel is presented, and a total of 153 different proteins, identified were retrieved from 200 spots detected in the gel. Relative quantification from this 2D map and comparison with the vacuolar cartography provided new insights into the composition of these essential compartments, where intracellular trafficking and signaling take place. This work also presents the very first report of the exploration of the supramolecular organization of the soluble *Arabidopsis* vacuolar proteome by 2D Blue Native / SDS-PAGE.

## *I. Material & Methods*

---

### ***Arabidopsis thaliana cell culture conditions***

*Arabidopsis thaliana* cells var. Columbia were maintained in Murashige & Skoog medium (MS basal medium, Sigma, catalog number M5519, sucrose 88 mM, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid 0.02 g·liter<sup>-1</sup>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2 mM pH 5.5), under constant

light ( $75 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) and shaking (135 rpm). Every 7 days, 100 ml of fresh medium were inoculated with 5 ml of packed 7-day-old cells (110 g for 5 min).

### ***Vacuoles isolation and protein preparation***

Vacuoles were purified as previously described (Jaquinod *et al.* 2007) with slight modifications. Briefly, 18 g of 5-day-old cells were submitted to enzymatic digestion (0.6 M mannitol, 2% (w/v) cellulase, 0.5% (w/v) pectolyase, 25 mM MES, pH 5.5), filtered through a 50- $\mu\text{m}$  nylon net and washed in 0.7 M mannitol, 10 mM Tris, 15 mM MES, pH 7.0. After centrifugation (1 min at 200) protoplasts were submitted to osmotic shock by diluting 4-fold in medium A (0.2 M mannitol, 10% (w/v) Ficoll 400, 20 mM EDTA, 5 mM HEPES-KOH, pH 7.5), prewarmed at 42°C. After a 15 min incubation, 1 volume of the resulting cell lysate was placed in a centrifuge tube, and overlaid with 2 volumes of a mixture (1:1, medium A: medium B) (medium B: 0.4 M betaine, 30 mM KCl, 20 mM HEPES-KOH, pH 7.5) and 1 volume of medium B. After centrifugation (1800 g for 20 min), vacuoles collected from the interface medium A+B / medium B present sometimes slight contamination by chloroplasts and intact protoplasts. They were further purified as followed: 1 volume of this fraction, obtained from 6 centrifugation tubes, was diluted in 1/10 volume of medium A+B and placed in a new centrifuge tube. After addition of 1 layer of a mixture 1:3 media A:B (2 volumes) and 1 layer of medium B (1 volume), the gradient was centrifuged (1800 g for 20 min) and highly purified vacuoles collected from the interface medium A+B / medium B. Vacuoles were then frozen in nitrogen and stored at -80 C until used.

Total vacuole disruption was ensured by two cycles of thawing / freezing in liquid nitrogen, and treated, or not, with 0.55 M NaCl for 60 min at 4°C). The suspension was then centrifuged for 60 min at 100,000 g and the supernatant used for proteomic analysis.

### ***Cytosol-enriched fraction preparation***

After the first gradient centrifugation used to purified *Arabidopsis* vacuoles from cell culture, the heaviest Ficoll layers of the gradient tubes (initially corresponding to the cell lysate), clear from organelles and protoplasts, was collected and submitted to additional centrifugations, first at 20,000 g (for 15 min, at 4°C) to remove remaining organelles (mitochondria, plastids, nuclei ...) and then at 100,000 g (for 30 min, at 4°C) to pellet membrane fragments.

### ***IEF / SDS-PAGE 2D electrophoresis***

For semi-quantitative analysis of the strictly soluble vacuolar proteome, intact organelles were submitted to 2 cycles of freezing/thawing followed by high speed ultracentrifugation (30 min

at 100,000 g, 4°C) in absence of any salt. Samples, consisting in 175 µg of soluble vacuolar or cytosolic proteins, were collected from several preparations and precipitated in 12.5 % TCA. Electroisofocalisation (IEF) was performed in home made linear pH gradient gels (160mm long, 3.0-6.75), according to previously published procedures (Rabilloud *et al.* 1994). Strips (4 mm wide) were cut, and rehydrated overnight with the sample, diluted in a final volume of 0.6 ml of rehydration solution (7 M urea, 2 M thiourea, 4 % CHAPS, 0.4 % carrier ampholytes (Pharmalytes 3-6.75) and 100 mM dithiodiethanol) (Lucche *et al.* 2004, Rabilloud *et al.* 1997). The strips were then placed in a multiphor plate, and IEF of proteins was carried out with the following electrical parameters: 100 V for 1 h, 300 V for 3 h, 1000 V for 1 h, 3400 V up to 60-70 kVh. After IEF, the gels were equilibrated for 20 min in 125 mM Tris, 100 mM HCl, 2.5 % SDS, 30 % glycerol and 6 M urea. They were then transferred on top of the SDS gels and sealed with 1% agarose (dissolved in 125 mM Tris, 100 mM HCl, 0.4 % SDS and 0.005 % (w/v) bromophenol blue). 10%T gels (160x200x1.5 mm) were used for protein separation. The gel buffer system was the classical Laemmli buffer pH 8.8, used at a ionic strength of 0.1 instead of the classical 0.0625. The electrode buffer was 50 mM Tris, 200 mM glycine, 0.1 % SDS. The gels were run at 25 V for 1 hour, then 100V until the dye front has reached the bottom of the gel. Detection was carried out by colloidal Coomassie Blue staining (Neuhoff *et al.* 1988), and gels digitized.

### ***1D Blue Native (BN) -PAGE and 2D BN / SDS-PAGE electrophoresis***

For native electrophoresis of total or soluble fractions of intact vacuoles, organelles were submitted to 2 cycles of freezing/thawing followed by high speed ultracentrifugation (30 min at 100,000 g, 4°C) in absence of any salt, to avoid multimers dissociation. BN-PAGE were performed following an adapted method firstly used for observation of mitochondrial respiratory complexes (Schagger and von Jagow 1991).

Proteins from the soluble fraction (100 to 120 µg) were concentrated using a Microsep (Pall Filtron, 3 kDa cut-off), 10-fold diluted in the following buffer: 50 mM NaCl, 5 mM amino-caproïque acid, 50 mM imidazole-HCl (pH 7.0), and concentrated until it reached *ca.* 1 µg·µL<sup>-1</sup>. At last, 10 % (v/v) glycerol was added. Proteins were then loaded onto a gel consisting in an acrylamide gradient (5% - 13% [w/v]) in the following medium: 500 mM amino-caproïque acid, 25 mM imidazole-HCl (pH 7.0), overlaid by a stacking gel of identical composition but containing 4 % (w/v) acrylamide. Cathode buffer was first 50 mM tricine, 7.5 mM imidazole, Coomassie blue G250 0.02 % (w/v) until migration reached the first third of the gel, and was then replaced by an identical one but containing 0.002 % (w/v) Coomassie blue. Anode buffer was composed of 25 mM imidazole-HCl (pH 7.0), and the run was



performed at 4°C, 80 V. Proteins from the total vacuolar fraction (100 to 150 µg) were first washed 1min in 250 µL of 250 mM Sorbitol, 50 mM Bis-Tris (pH 7.0) and centrifuge (30 min at 100,000 g, 4°C). The resulting pellet was re-suspended in 750 mM amino-caproic acid, 1% (w/v) dodecylmaltoside, 50 mM Bis-Tris (pH 7.0) to a final concentration of *ca.* 5 µg·µL<sup>-1</sup>. Protein solubilization was then carried out in ice for 1 hour, and the sample subjected to a last centrifugation (same conditions). The supernatant was carefully placed in a new tube, and 0.5 % (w/v) Coomassie blue G250 was added from a 5 % (w/v) stock solution, together with 10 % (v/v) glycerol. Electrophoresis was performed in a 5% - 13% [w/v] acrylamide gradient gel in the following buffer: 500 mM amino-caproic acid, 50 mM Bis-Tris pH 7.0. Cathode buffer was composed of 50 mM Tricine, 15 mM Bis-Tris, 0.02 % or 0.002 % (w/v) Coomassie blue G250 and anode buffer was composed of 50 mM Bis-Tris pH 7. Electrophoresis performed at 4°C, 80V. Both kinds of BN-PAGE were realized using the SE 260 Mighty Small II apparatus (Hoefer, San Francisco, USA). After migration, proteins were fixed and revealed by colloidal G250 Coomassie blue staining (Neuhoff *et al.* 1988).

When required, a second dimension under denaturing conditions was performed. The migration lane of the BN-PAGE (not previously fixed) was cut out and incubated in classical Laemmli buffer supplemented with 1% (w/v) SDS and 1% (v/v) β-mercaptoethanol, for 1 h at room temperature. The lane was then rinsed 3 times, for 10 min, in water, placed at the top of a resolving usual SDS-PAGE (12% acrylamide in Tris pH 8.8), and sealed with stacking gel (5% acrylamide in Tris pH 6.8). Electrophoresis was carried out at 60V under standard conditions, and protein gels were placed in several successive baths with shaking (100 rpm) to reveal the proteins by silver staining.

### ***Mass spectrometry analysis***

For in-gel digestion, 20 µg of proteins from the soluble fraction were separated by a short electrophoresis (2.5 cm) by 10% SDS-PAGE. After coloration with Coomassie Blue G250, the gel was cut into 1.5-mm slices and the proteins present in each band were treated and digested as mentioned in Jaquinod *et al* (2007). Analyses of mix peptides were performed on a nano-LC system coupled to an OrbiTRAP mass spectrometer (ThermoFinnigan). Peptide digests were first concentrated on a 300 µm x 5 mm PepMap C18 pre-column (LC Packings-Dionex, Sunnyvale, CA) and then passed onto a home made C18 Gemini column (75 µm x 150 mm). Gemini phase phase was purchased from Phenomenex (Phenomenex, Le Pecq, France). Peptides were eluted with a gradient from 10% ACN, 0.1% formic acid to 80 % ACN, 0.08% formic acid (run duration 60 min, flow rate 300 nl/min). The mass spectrometer was operated in the positive ion electrospray ionization mode with a resolution of 30,000 full-



width half maximum and employed a data-dependent automatic switch between MS and MS/MS acquisition modes. Data-dependent analysis was used for MS/MS (X most abundant ions in each cycle): 1s MS ( $m/z$  400–1400) and maximum 4 s MS/MS ( $m/z$  50–2000, continuum mode) with 2 min dynamic exclusion. A peaklist was created for each analyzed fraction (i.e. gel slice) and individual Mascot searches were performed for each fraction. Data were searched against *Arabidopsis thaliana* complete database (TAIR 9) using MASCOT 2.1 Mascot Daemon search parameters used with MS/MS data were: enzyme = trypsin/P, one missed cleavage allowed, a peptide tolerance = 5 ppm, MS/MS tolerance = 0.6 Da, peptide charge = 2+/3+ and variable modifications. For the in-gel digestion procedure, these were N terminus protein acetylation, oxidized methionine under sulfone and sulfoxide, Cysteic acid. *Arabidopsis thaliana* target-decoy database search was then performed. Validation and false positive rate assessment were performed using IRMa a home made software[26]. Automatic data validation was carried out using the following parameters: i) the number of report hits was fixed automatically to retrieve proteins with a p-value, as defined by Mascot, such as  $p < 0.05$ , ii) only peptides ranked first and with an identity threshold such as the p-value, as defined by Mascot, corresponded to  $p < 0.05$ , were kept. Considering those validation parameters the false discovery rate (FDR), as proposed by Peng *et al.* (2003) was estimated to be 5.5 % for the overall identification database. Identifications were automatically consolidated to a mass spectral identification database (MSIdb) using the IRMa toolbox (Dupierris *et al.* 2009). From the so-generated protein groups an additional validation step was added. Protein groups represented by more than one peptide were automatically kept and protein groups identified by a single peptide were kept only if the corresponding peptide had a Mascot score above 35. For protein identification from 2D gels (IEF/ and BN/ SDS-PAGE), protein and peptides were prepared as described in Sarry *et al.* (2006). Nano-liquid chromatography, Q-TOF and bioinformatics analyses were performed as described in Jaquinod *et al.* (2007).

## ***II. Results***

---

### **II.1 - Dissection of the soluble vacuolar proteome from *Arabidopsis thaliana* cultured cells**

#### **II.1.1 - Vacuole purification and global proteomic analysis**

Vacuoles were purified from *Arabidopsis* cell culture. Two procedures were used, the first one is the procedure previously described (Jaquinod *et al.* 2007) and second contains a slight modification allowing the purification of vacuoles using two sequential Ficoll gradients (Figure 1A). These methods allow for the purification of intact vacuoles, free of contaminations by other subcellular compartment as assessed by western-blot analysis on proteins specific to the plasma membrane, mitochondrion, chloroplast and endoplasmic reticulum (Jaquinod *et al.* 2007). Purified vacuoles were then disrupted by two cycles of freezing / thawing, and the soluble proteome collected after centrifugation in presence or in absence of membrane salt washes (see Materials and Methods). The general “shotgun” proteomic strategy used in this work is described in Figure 1. The soluble proteins were subjected to 1D SDS-PAGE fractionation before MS-based protein identification. A short migration (2.5 cm) was carried out to obtain partial protein separation, the gel was cut in 15 bands, each separately analyzed to decrease the sample complexity and improve the analysis completeness. An oxidation procedure (peroxide treatment) was applied to the protein samples before MS identification in order to increase the peptide coverage, to provide a better quality of the MS/MS spectra and also to decrease the time of sample preparation compared with the classical reduction/alkylation approach (Jaquinod *et al.* 2007). LC-MS/MS analyses of the soluble proteome without salt treatment using an orbitrap MS revealed the identification of 504 proteins, whereas the soluble proteome obtained from a salt treatment and analyzed by Q-TOF MS allowed the identification of 373 proteins. These data are displayed in supplemental Table 1 and 2. As the analysis with the orbitrap MS allows the identification of the major proteins identified by Q-TOF MS, we have focused our analysis essentially on the data obtained with the Orbitrap MS. The identified proteins obtained with the Orbitrap MS were functionally classified as function of MIPS (FunCat), KEGG or GO nomenclatures in the supplemental Table 2. These proteins were also classified according to the protein family and superfamily they belong to (supplemental Table 2). Among them, the transporters are represented by 13 subunits of the vacuolar (V-Type) ATP hydrolase belonging

to V1 domain (VHA-A, VHA-B1 & 2, VHA-C, VHA-D, VHA-E1, VHA-H) or to the V0 one (VHA-a2,a3 & c3, VHA-c''2 & VHA-d1 & 2) (Jaquinod *et al.* 2007, Sze *et al.* 2002). Interestingly, this is the first protein identification of the predicted VHA-c''2 subunit since neither the VHA-c'' nor the VHA-e subunits were identified before (Schumacher and Krebs 2010). All these VHA subunits were most likely released from the H<sup>+</sup>-pumping ATP hydrolase complex during the preparation of the soluble vacuolar fraction following tonoplast rupture and are well represented in term of protein abundance in the soluble fraction. As an example, VHA-a3; VHA-a2 and VHA-A are among the thirty most abundant proteins of the vacuolar soluble proteome as evaluated by spectral count (Supplemental Table 2). Fifty nine other transporters including 7 members of the major facilitator superfamily (see supplemental Table 2) were also identified by our present work, the majority of them being also identified in our previous proteomic study on *Arabidopsis thaliana* tonoplast (Jaquinod *et al.* 2007) and will not be discussed here. The present proteomic study revealed that a great majority of the proteins identified in the vacuolar soluble proteome are related to hydrolysis activities (Supplemental Table 2). Among the most represented families in term of number of identified proteins and relative abundance (spectral count) in the vacuolar proteome are the glycosyl hydrolases with 51 proteins (representing 10.1 % of all the identified proteins, Supplemental Table 2, Table 1) and the peptidases with 72 identifications (14.5 % of all the identified proteins, Supplemental Table 1, Table 2). Other hydrolases include members of the hydrolysis superfamily (34 proteins) involved in several degradation processes, 7 members of the lipase superfamily, various metallophosphoesterases (8), phosphoesterases (8) and members of the amidohydrolase superfamily (7). Oxidoreductase enzymes are also well represented, with 66 proteins identified, 8 of them belonging to the peroxidase surperfamily and 20 to the dehydrogenase family. Additionally, numerous transferases were identified (25 members) including 9 aminotransferases, 6 methyltransferases and 5 glutathione S-transferases (supplemental Table 2). Many proteins involved in signal transduction were also highlighted, such as proteins of the small GTPase superfamily and of the protein kinase superfamily, and 36 proteins with unknown functions were identified in this work (supplemental Table 2). Because of the large number of proteins identified we will focus our detailed analysis only on the glycosyl hydrolases and peptidases.

### II.1.2 - Glycosyl hydrolases

Glycoside hydrolases (GHs) are enzymes involved in the breakdown of carbohydrates, playing important roles in various physiological processes including cell wall polysaccharide

metabolism, biosynthesis and demodulation of glycans, plant defense, symbiosis, signaling and secondary plant metabolism (Henrissat *et al.* 2001, Minic 2008). Among the 35 families of GHs represented in the *Arabidopsis* genome (Henrissat *et al.* 2001), 27 were represented in the soluble proteome of the *Arabidopsis* vacuoles. This corresponds to 51 different degradative enzymes, out of the 400 GHs predicted in the *Arabidopsis thaliana* genome. These GHs are presented in Table 2 according to the Carbohydrate-Active Enzymes nomenclature (<http://www.cazy.org/CAZY/index.html>) (Coutinho and Henrissat 1999) and those identified by other proteomic works are also mentioned (Carter *et al.* 2004, Jaquinod *et al.* 2007, Shimaoka *et al.* 2004). Among the 51 GHs identified in the present work, only 18 had previously been found by Carter *et al.* (2004). Interestingly, 8 and 7 were also identified in the work of Shimaoka *et al.* (2004) and Jaquinod *et al.* (2007), respectively, even though they were performed on the membrane fraction of the vacuoles (Table 1). In particular, we found that the  $\alpha$ -mannosidase (GH38 family protein, At3g26720), similar to the human lysosomal enzyme, is the most represented glycosidases, based on the spectral count and Mascot score obtained (422 and 5066 respectively) (Table 1). Two other  $\alpha$ -mannosidases were also identified (At5g13980 and At5g66150). These proteins may constitute the subunits of an abundant constituent of the plant hydrolytic system which is considered to be involved in the degradation of *N*-glycosylated proteins in the vacuole or protein body; An  $\alpha$ -glucosidase of type I from the GH31 family (At5g11720) was also identified. This exo-acting GH is responsible of the release of  $\alpha$ -D-glucose from heterogeneous substrates, such aryl glucosides and sucrose (Frandsen and Svensson 1998); a  $\beta$ -galactosidase (GH35 family protein, At2g32810) that catalyzes hydrolysis of terminal  $\beta$ -galactosyl residues from carbohydrates, galactolipids, and glycoproteins (Ahn *et al.* 2007); a putative  $\alpha$ -galactosidase (or melibiase, At3g56310) and a  $\beta$ -N-acetylhexosaminidase (HEXO1, At3g55260). The latter enzyme was proposed to be responsible of the processing of *N*-glycans by catalysing the release of the terminal GlcNAc residues conducting to the synthesis of paucimannosidic *N*-glycans, major components of plant glycoproteins. The 3 isoforms HEXO1, 2 and 3 were recently cloned and HEXO1 was shown to be a vacuolar protein whereas HEXO2 and 3, not identified in this work, are mainly located at the plasma membrane (Strasser *et al.* 2007). Seven other abundant GHs identified in our work were also identified by Carter *et al.* (2004) (Table 1). Among them, we have identified an endo- $\beta$ -mannosidase (a GH2 family protein, At1g09010) with a Mascot score of 3790 (and a spectral count of 274), a novel endoglycosidase that hydrolyzes the Man $\beta$ 1-4GlcNAc linkage in the trimannosyl core structure of *N*-glycans (Ishimizu *et al.* 2004), a  $\beta$ -xylosidase (At5g10560) (Hruba *et al.* 2005), two polygalacturonase (pectinase)

members of the GH28 family (At3g16850, with a Mascot score of 1545 and At3g62110, with a Mascot score of 685), an  $\alpha$ L-fucosidase (At2g28100, Mascot score of 1525), an  $\alpha$ L-arabinofuranosidase (At3g10740, with a Mascot score of 2308) and an  $\alpha$ -N-acetylglucosaminidase (At5g13690, Mascot score : 948). The two well-known vacuolar invertases ( $\beta$ -fructofuranosidase, BFRUCT3 and 4, At1g62660 and At1g12240 (Ji *et al.* 2005) were also identified with the cytosolic one corresponding to the less abundant GH identified in this work. A fourth enzyme annotated also as an invertase (At1g55120, AtcwINV3) present in the vacuole proteome was recently characterized as a fructan exohydrolase (FEH) and not an invertase (De Coninck *et al.* 2005). Interestingly, these two types of GH are very closely related enzymes at the molecular and structural level but are functionally different and a single amino acid substitution converts an invertase activity into a fructan exohydrolase one (Le Roy *et al.* 2007).

Among the other abundant GHs identified in our work and listed in Table 1, are some GHs involved in plant defense. In this category, we have identified three chitinases (At3g12500, also identified by Shimaoka *et al.* (2004); HEL, At3g04720 and At2g43570, one  $\beta$ -1,3-glucanase classe 1 that belongs to the pathogenesis-related proteins (PR-2) (At4g16260), known to be vacuolar and accumulates in mature leaves and roots in response to pathogen aggression (Minic 2008) and an other pathogenesis-related proteins (PR-4; At3g04720).

### II.1.3 - Peptidases

In the *Arabidopsis thaliana* genome, many genes with sequence similarities to known hydrolases have been identified. As an example the specialized Arabidopsis protease database MEROPS (release 9.5) contains 863 Arabidopsis entries (van der Hoorn 2008)), corresponding to roughly 3 % of the proteome (Rawlings *et al.* 2008). These proteolytic enzymes are involved in numerous important processes of the plant development and physiology (Beers *et al.* 2004, Schaller 2004b). However, protease activity as well as location has only been established for a small amount of them. Most of these putative proteases are found in extended gene families and are likely to have overlapping functions, complicating attempts to determine the roles of the different proteases in the plant metabolism. No less than 75 proteases were identified in the present study corresponding to all five catalytic types: aspartyl proteases (or aspartic peptidase, A1 and A22 sub-families), cysteine proteinases (C1, C1A, C13, C15, C19 and C26 sub-families), metallopeptidases (M1, M9, M12A, M17, M18, M24, M28, M38 and M41 sub-families), serine proteases (S5A, S8, S9, S10, S28, S33 and

S58 sub-families) and threonine peptidases (T1 and T3 sub-families). In addition to this, 4 protease inhibitors, involved in proteolytic activity regulation were also identified (Table 2).

#### II.1.3.1 - Aspartic proteases

Aspartic proteases are present in all organisms (Davies 1990, Dunn 2002), and plant members of this family present 2 aspartic residues responsible of their activity (Rawlings and Barrett 1995) as well as a plant specific insert, which exact role is still not understood (Simoes and Faro 2004). These enzymes are active, depending on the plant specie, as single- or double-chains protein. In the later case, conditions of the proteolytic activation remain to be identified. Five proteins belonging to this family were identified in our work, three of them being A1 aspartic proteases, active at acidic pH, and the most representative family of the plant aspartic proteases, while two are A22 family members (Table 2).

#### II.1.3.2 - Cysteine proteases

Cysteine proteases are the predominant class of proteases in plants and play house-keeping function to remove abnormal, misfolded or degraded proteins. They are also involved in the degradation of storage proteins, senescence and programmed cell death (PCD) (Schaller 2004a). In protozoa and mammalian cells, these types of enzymes mainly contribute to proteolytic activities of the digestive vacuoles and lysosomal system. The plant enzyme counterparts identified in this work are also involved in protein maturation, degradation, and protein rebuilt in response to different exterior stimuli (water deficiency for example) (Koizumi *et al.* 1993, Wisniewski and Zagdanska 2001). Twenty two cysteine peptidases and one cysteine protease inhibitor (phytocystatin) were identified (Supplemental Table 2, Table 2). Among the thirteen members of the papain-like Cys proteases, RD21A and RD21-like enzymes (At1g47128, At3g19390, At3g19400 and At3g43960), which are dehydration responsive and Cathepsin B like proteins (At4g01610 and At1g02305) are particularly abundant in the soluble vacuolar fraction. RD21A, which is the most abundant peptidase with a spectral count of 1098 (and a Mascot score of 1150), was shown to be strongly induced under high-salt conditions, suggesting that this protein could also play a role in the regulation of osmotic potential of plant cells (Koizumi *et al.* 1993). We also confirmed the presence of the xylem-specific papain-like cysteine peptidase (XCP1& 2, At4g35350 and At1g20850) in the vacuolar proteome with a spectral count of 38 and 39 (Table 2) (Funk *et al.* 2002). We also found 3 of the 4 Arabidopsis vacuolar processing enzyme ( $\gamma$ VPE, At4g32940;  $\beta$ VPE, At1g62710;  $\alpha$ VPE, At2g25940). VPEs are particularly important in maturing seeds because they are responsible for the correct processing of newly arrived seed proteins within protein



storage vacuoles (Shimada *et al.* 2003). VPEs are also essential for induction of PCD during virus-induced hypersensitive response (Hatsugai *et al.* 2004) and *Arabidopsis* mutants lacking all four VPE genes are insensitive to cell death induced by a fungal toxin (Kuroyanagi *et al.* 2005). VPE seems to be the equivalent of the animal caspase and functions as a key component in cellular suicide strategy triggered by vacuolar collapse (Hara-Nishimura *et al.* 2005, van der Hoorn 2008). In animals, dying cells are packaged into apoptotic bodies before engulfment by phagocytes (Hatsugai *et al.* 2006). Because plants are surrounded by rigid cell walls and are devoid of phagocytes they must degrade their own cell materials by themselves. VPEs are accumulated after perception of PCD-triggering stimuli (such as pathogen infection) and activates a process that provokes a breakdown of the tonoplast, followed by the liberation of vacuolar hydrolytic enzymes which leads to the autophagy of the plant cell (Hatsugai *et al.* 2006). A targeted proteomic dissection is currently performed in our laboratories to identify VPE partners involved in this process.

Among the cysteine protease species, we have identified the 3 isoforms of  $\gamma$ -glutamyl hydrolase (AtGGH1-3) involved in the removal of the polyglutamyl tail from folyl and *p*-aminobenzoyl polyglutamates confirming the fundamental role of the vacuoles and its GGH in folate homeostasis (Akhtar *et al.* 2010, Orsomando *et al.* 2005). Folates (tetrahydrofolate and its derivatives) are indispensable cofactors in one-carbon metabolism (Douce *et al.* 2001). Experiments of modulation of GGH activity revealed a direct impact of polyglutamylation on intracellular folate contents (Akhtar *et al.* 2010). GGH activity is confined in pea leaf and beet root vacuoles (Orsomando *et al.* 2005) and in the present work, we showed that the 3 GGH isoforms are located in the *Arabidopsis* vacuoles. As these organelles are also the cellular storage site of folylpolyglutamates (Orsomando *et al.* 2005), this implies that these polyglutamate derivatives have to be also protected from GGH activity, which could be attributed to the presence of protease inhibitors in the vacuolar sap.

#### II.1.3.3 - Serine proteases

Like cysteine proteases, and as opposed to metalloproteases or aspartate proteases, serine proteases link covalently their substrate to hydrolyse it. With more than 200 members divided into 14 families, they are the largest class of proteolytic enzymes in plants (van der Hoorn 2008) and the most represented proteases in our analysis (25 over 75 peptidases identified). They are involved in a wide range of metabolic processes including protein turnover, sporogenesis, development, stress response or symbiosis (Antao and Malcata 2005). The most represented family in our analysis with 10 members corresponds to the serine

carboxypeptidase-like (SCPL). This is not surprising since SCPLs are distinct from other serine proteases in that they are active only at acidic pH (van der Hoorn 2008). They present various expression profiles as a function of the plant tissues (Fraser *et al.* 2005) and interestingly, 2 of them, SCPL 29 and SCPL 49, show a weak accumulation level of their mRNA, as evaluated by RT-PCR whatever the tissue considered (Fraser *et al.* 2005), while they present in our study a relatively high spectral count scores (67, Table 2) and a high Mascot score (1184 for SCPL 29 and 934 for SCPL 49).

Five subtilisin-like serine proteases (subtilases), out of 56 predicted in the genome were identified in our work. Three main functions have been proposed to be related to this family: control of development, protein turn-over and signaling events (Rautengarten *et al.* 2005). One identified subtilase, the tripeptidyl peptidase II (TPPII), has been shown in mammals to interact with the proteasome, acting as an intermediary enzyme involved in the further degradation of the larger proteasome-derived peptides (> 15 residues) into tripeptides (Book *et al.* 2005, Walling 2006). Recently, the 20S proteasome proteolytic pathway (i.e. the 20S proteasome and the peptidases acting sequentially downstream from the proteasome: tripeptidyl-peptidase II, thimet oligopeptidase and leucine aminopeptidase) has been shown to be up-regulated at both RNA and protein activity levels in Arabidopsis in response to Cd stress and may play a major role in degrading oxidized proteins generated by oxidative stress (Polge *et al.* 2009). Described to be cytosolic in animals, its presence in our extracts is however most probably not due to contaminations from the cytosol since this protein presents one of the highest spectral counts of our study (768, Table 2) (with the highest MASCOT score: 6035 with a sequence coverage of 51.4 %). This unexpected result could highlight a specific interaction of the TPPII with the vacuoles, suggesting a direct cooperation of this protease with the vacuole.

#### II.1.3.4 - Metalloproteases

Metalloproteins are a well represented peptidase class in Arabidopsis since its genome comprises 81 genes classified in 12 different clans. Metalloproteases in plants include exo and endopeptidases in many different presumed subcellular locations. To date, only very few of these enzymes have been finely characterized and comprehensively localized in plants (Schaller 2004a). Among the most abundant metalloproteases identified, based on the spectral count, the LAP family proteins (Leucine aminopeptidase - M17 family) are well represented since LAP1 and LAP2 are present with a spectral count of 317 and 172 respectively (Table 2) whereas LAP3 is less represented (22, Table 2). These peptidases are active in a hexameric form, and facilitate the turnover of peptides that are released from endoproteases or large



proteolytic complexes such as the proteasome or TPPII (Narvaez-Vasquez *et al.* 2008, Polge *et al.* 2009). It is interesting to notice that another endopeptidase (the thimet oligopeptidase, TOP, At5g65620) was also identified in the soluble compartment in presence of salt (Supplemental Table 1).

#### II.1.3.5 - Threonine proteases

Threonine proteases were identified in the vacuolar sap: two uncharacterized expressed proteins having peptide-N4-(N-acetyl-beta-glucosaminy) asparagine amidase activity (Table 2) and a  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase (GGT3/4, At4g29210, Table 2). Our proteomic work confirmed the vacuolar localization of this later enzyme involved in the degradation of glutathione conjugates since this enzyme was recently shown to be present in the lumen of *Arabidopsis* vacuoles (Grzam *et al.* 2007, Ohkama-Ohtsu *et al.* 2007b). Among the three other known members of this small gene family, GGT1 and GGT2 were shown to be apoplastic, associated with the plasma membrane and /or cell wall (Martin *et al.* 2007, Ohkama-Ohtsu *et al.* 2007a) and were not identified in our work. Interestingly, when the soluble proteins were isolated in presence of salt, sixteen other threonine proteases were identified. They correspond to the 13 subunits of the 20S proteasome (supplemental Table 1 & 2), identified with high MASCOT scores for most of them, suggesting a co-purification of this complex with the vacuoles. Interestingly, we also identified an ubiquitin-related protein (At1g31340, supplemental Table 1) and an ubiquitin fusion degradation UFD1 family protein (At2g21270, supplemental Table 1) further confirming that several components of the proteasome-dependant degradation pathway are co-purified with the vacuole, and thus could be associated to this organelle.

## **II.2 - Identification of the major soluble vacuolar proteins after separation by two-dimensional gel electrophoresis**

To gain better insights into the organization of the soluble vacuolar proteome, and especially to characterize it from a more quantitative point of view, we decided to identify major components of this fraction by 2D IEF/SDS-PAGE electrophoresis followed by MS/MS analyses. Vacuoles were purified according to the method of Jaquinod *et al.* (2007) and the soluble proteins separated from the membranes (without salt treatment) by centrifugation. Three different samples, each made from an average of 8 to 9 vacuole preparations pooled together, were constituted and separately analyzed by high resolution 2D (IEF)/SDS-PAGE

using home-made immobilized linear pH gradients of 3.0 to 6.75, corresponding to the physiological pH range of the vacuoles. After G250 Coomassie blue staining, gels were digitized and images processed using PDQuest (Bio-Rad, USA) software. Figure 2 (A, B and C) shows the 3 obtained gels. The gel presenting the best staining was used for MS analysis and computational processing, the digital gel, created from it, is reported on Figure 2D. A total of 152 spots were resolved. Seventy-five spots corresponded to one protein only, 65 led to the identification of 2 or more proteins and 12 spots did not contain any detectable peptides. Identification of 90 proteins were retrieved from this analysis, whereof 9 had not been previously identified (Supplemental Table 3). All the functional categories identified from the first global analysis were observed in this subset of proteins, but their relative abundance was modified. Proteases and glycosidases, however, were still the most represented families with 19 and 11 proteins, respectively. Proteins belonging to the “signaling pathways” group (11 identified) were also well represented. This functional category contains 5 newly identified proteins: 2 calcineurin-type phosphatases, including CBL2, recently crystallized (Akaboshi *et al.* 2008), a phosphodiesterase and 2 G proteins: ARA5 et ARA6. Transporters and binding proteins (8 identified) were almost exclusively represented by subunits of the V-Type ATPase, 6 of them being identified, all belonging to the V1 (soluble) domain (VHA-A, B2, B3, C, D, E1). Conversely, some functional categories are poorly represented in this proteome subset. Proteins involved in stress response, for instance, correspond to about 7% of all the identification (vs. 3 % in the shotgun analysis based on MapMan functional annotation), suggesting that members of this protein family are expressed at a relatively low level, even though the protein diversity is important. This aspect of quantification has been more investigated using PDQuest software, *via* the quantification of each spot (supplemental Table 4). Table 3 reports the 20 most intense spots of the gel, together with their protein contents. 24 proteins were identified from these 20 main spots, some being individualized (spots 1 and 29, for instance, correspond to a PLAT/LH2 and a putative peroxidase, respectively) while other spots contained several proteins (spots 9: At5g60360 and At4g29260). Interestingly some proteins were also identified in several spots (SOUL heme-binding protein: spots 8 and 10), which most probably correspond to post-translational modifications. The later protein (SOUL heme-binding protein, At1g17100) is for example likely to be present under both heme-binding and heme-free states, that is very likely to change its isoelectric point as has already been observed for human proteins (Plancke *et al.* 1978, Plancke *et al.* 1977). Interestingly, this protein is one of the most abundant of the soluble vacuolar proteome, since its cumulative relative abundance reaches *ca.* 4.8 % of the resolved spots (Table 3). Among the 20 major spots, 8 correspond to (or contain) proteases (7 different), further confirming their high

representation in both terms of diversity and abundance (Table 3). Glycosidases, phosphatases / phosphodiesterases and subunits of the V-ATPase groups are each represented by 3 proteins, while only one belonging to the “stress response” category is present (peroxidase PER54, At5g06730), although this protein is the second most abundant one in the gel (5.3 % of the resolved spots, Table 3). The most important protein, in terms of abundance, of our soluble extracts reach the unexpected value of more than 7.5 % of the quantified spots, and correspond to a Polycystin-1, Lipoxygenase, Alpha-Toxin / Lipoxygenase Homology (PLAT/LH2). Two proteins belonging to this family were identified in our global analysis (At2g22170 and At4g39730), but only one is present in the 2D gel (At4g39730). These proteins do not have any well established role in the cell, however they could be involved in several cellular processes *via* the production of oxylipins, which are signalling molecules that require lipoxygenases for their synthesis (Blee 2002).

Notably, none of the proteins classified as primary (C or N) metabolism components were present in the 20 most intense spots, while they correspond to 12 % of the 90 identified proteins from this analysis. This observation could confirm the hypothesis of a slight contamination of our sample by major cytosolic proteins, attached to the membrane or being digested after autophagy processes. This phenomenon would also explain the presence of other proteins described to be localized in the cytosol such as the TPPII, many proteasome subunits or several 14-3-3 family proteins. To further investigate this hypothesis, we undertook a semi-quantitative analysis of the cytosolic proteome in order to identify major constituents of this cellular compartment. The goal of this study was to evaluate whether contaminants from the cytosol identified in our vacuolar fractions correspond to major cytosolic proteins, suggesting a non-specific, random co-purification of cytosolic constituents with the vacuoles, or whether there is a more targeted association of some cytosolic proteins with the vacuoles.

### **II.3 - Comparison of the soluble vacuolar map with that of the cytosolic proteome**

During sub-cellular fractionation, protoplasts are disrupted in a manner allowing the preservation of organelles intactness, especially the very fragile vacuoles. Protoplast lysate, placed as the heaviest layer in the first Ficoll gradient used to purify vacuoles, contains intact organelles and protoplasts, but also cytosol, released from lysed protoplasts. After centrifugation, most of the protoplasts and organelles pelleted or rose up, leaving this layer highly enriched in cytosolic proteins. Protein contents of this cytosolic extract were analyzed

by 2-DE cartography to identify major components and to evaluate the relative proportion. As cartographies from vacuolar and cytosolic samples were meant to be compared to each other, and to avoid improbable fluctuation of protein expression between preparations, we collected cytosol-enriched fractions from gradients that were used to isolate vacuoles to be used for the 2D electrophoresis, and pooled them in identical proportions. The 2-DE analysis was performed in triplicate, using 175 µg of cytosolic proteins for each replicate (Figure 3). Isoelectrofocalisation, coloration and digitalization of the gels were carried out as mentioned for vacuoles. 256 spots were resolved, of which protein content was identified via 200 analyses by mass spectrometry leading to the identification of 153 proteins (Supplemental Table 3). Functional categorization of the identified proteins, based on the MIPS FunCat categories (Ruepp *et al.* 2004), revealed the predominance of enzymes involved in the primary metabolism (in terms of both number of identified proteins and estimated protein ratio evaluated from the relative spot intensity), represented by 45 proteins mainly involved in carbon metabolism including the well known enzymes of the cytosolic glycolysis pathway. Proteins of the cell rescue/stress response also represent a major category of the cytosolic proteome. Twenty-three proteins with cell protection functions were retrieved from this analysis, including 6 HSP (4 HSP70 and 2 HSP81) and 2 GST (GSTU19, GSTF10) for example. This category is not only predominant in terms of proteins number, but also in protein amount, as assessed by evaluation of the relative spot intensity from the gel. Proteases are relatively abundant as well (20), and almost half of them belongs to the proteasome. In contrast, some functional categories are poorly represented, or are represented by proteins of weak diversity. Only 1 glycosidase is identified (At2g40840), and proteins involved in lipid remodeling are only represented by a phospholipase D (At3g15730). Unexpectedly, proteins of the signaling pathways are only 10, whereof 7, however, belongs to the 14-3-3 family, already mentioned as components of the vacuolar or vacuole-associated proteome. At last, several other proteins play housekeeping roles are cytoskeleton-related (profilin 1 and 2) or are components of the protein synthesis metabolism. A semi-quantitative analysis, using PDQuest software, was performed and Table 4 gives a summary of the cytosolic proteins identified in the 20 major spots (denoted by bold, underlined numbers in Figure 3). When several spots were analyzed together, the given intensity is the cumulative one of each independent spot. The importance of enzymes involved in the primary metabolism is confirmed, here in quantitative terms. A bisphosphate aldolase has been identified in spots 27 and 28 and probably count for more than 3.8 % of the proteome observed in the gel, a triose-phosphate-isomerase is present in spots 17 and 18 and corresponds to roughly 3.5 % of the resolved spots, and a malate dehydrogenase (spot 28b) is contained in a spot having more than

1.9 % of the 2D proteome intensity. The presence of a superoxide dismutase (SOD, At4g25100), is far less expected, since this protein is proposed to be chloroplastic. HSP, GST and 14-3-3 family proteins are also among the major proteins of the cytosolic proteome, together with annexins for example, which could represent about 3.4 % of the total spot intensities.

In order to determine the origin of the cytosolic proteins present in our vacuolar protein samples, vacuolar and cytosolic cartographies were compared to each other (supplemental Figure 1). Protein patterns were obviously different and a careful analysis indicates that only 13 proteins were present in both compartment cartographies. Interestingly, among them only three concerns proteins that are found as major cytosolic proteins: annexin 1, which is one of the major protein present in the cytosol (At1g35720, spots # 24, 25, 142, 144 to 147, in Figure 3) is identified as a weak spot in the vacuolar cartography (spots # 107, Figure 2D); it is also the case of the triosephosphate isomerase (At4g55440, spots # 17, 18, 57, 97, 101, 102 in the cytosolic proteome study, Figure 3; spot # 80 in the vacuolar one, Figure 2D ) and a GST (At2g30870, cytosol: # 19, 20, 102, 107; vacuole: #77). Conversely, some proteins which are low abundant proteins in the cytosol but known to be cytosolic are well represented in the soluble proteome isolated from the vacuoles. As an example, RGP1 (At3g02330), identified in few spots in the cytosol cartography (spots # 27 and 142) is well represented in the vacuole one (spots # 109, 116, 117 et 118). Similarly, a dehydroascorbate reductase (At1g19570, vacuole: spot # 93, cytosol: spots # 16, 76, 84), and an aspartyl aminopeptidase (At5g60160, vacuole: spot # 190, cytosol: spots # 78, 79), which are known to be cytosolic, co-purify with the vacuole while they are not preponderant in the cytosol. In contrast, some major proteins of the cytosol (fructose bisphosphate aldolase, At3g52930; SOD At4g25100) are not present in the vacuolar cartography. Some proteins are even enriched in the vacuolar fraction, such as the TPPII (At4g20850), identified in the spot # 198 of the cytosol cartography (5 peptides identified, MASCOT score of 133.5), and in spots # 82, 120, 121, 137, 138, 139, 140 of the vacuolar one (up to 12 peptides identified, MASCOT score up to 661)

## **II.4 - Exploration of the supramolecular organization of the soluble Arabidopsis vacuolar proteome by blue native-SDS PAGE**

In order to analyse the supramolecular organization of the soluble vacuolar proteome, soluble proteins (~100 µg) prepared from purified *Arabidopsis* vacuoles were submitted to a first non-denaturant electrophoresis in the presence of G250 Coomassie blue. This technique has been

successfully used to separate complexes of the mitochondrion and the chloroplasts. Bands corresponding to potential protein complexes were hardly apparent during electrophoresis whereas they became visible after gel destaining and re-staining with R250 Coomassie blue.

A first round of MS-based identifications was performed directly on the first dimension. Bands corresponding to potential complexes were excised from the gel, and subjected to trypsin digestion followed by peptide extraction and MS/MS sequencing. Analyzed bands and their protein content are presented in Figure 4A. Among major putative complexes, a series of 4 bands ranging from 500 to 800 kDa presented identical protein constitution. Particularly interesting, they suggest an association between different protein families: proteases (3 serine proteases and 2 Meprin & TRAF domain family proteins), glycosidases (RGP1) and glycosidases inhibitors (PGIP1, PGIP2). The fact that the exact same protein composition was found in 4 different bands evokes a variable number of the protein subunits, but also strongly suggests that these bands are actual complexes. It seems very unlikely that several different complexes had co-migrated and were analyzed together in MS.

Two other bands corresponding to a complex size of 250 and 500 kDa contain two isoforms of the well-known vacuolar  $\alpha$ -mannosidase (At3g26720 and At5g13980, 106.5 kDa and 115.9 kDa respectively). This interestingly confirms that these enzymes are able to multimerize in plants, as already shown in *Saccharomyces cerevisiae*. Sizes of the bands indicate that they probably form dimers and tetramers, but it is still unclear whether they are heteromultimers, or homomultimers migrating together in the first dimension. It is noticeable that the dimer form seems to be extremely stable, since it remains as a single, large spot of 250 kDa, even after a second dimension of SDS-PAGE, in reducing conditions (Figure 4B, complex I).

In the 500 kDa band,  $\alpha$ -mannosidase seems to be associated with a  $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidase (HEXO1, At3g55260) which has been recently found to be located in the vacuole and participates to the *N*-glycan vacuolar trimming whereas the two other forms (HEXO2 & 3, not identified) are mainly located to the plasma membrane (Strasser *et al.* 2007). HEXO1 is present in two spots after the second dimension: ~60 kDa, corresponding to the predicted size of the full length protein, and ~47 kDa which could be attributed to the existence of a potential cleavage site, as predicted by SignalP (Emanuelsson *et al.* 2007). A leucine aminopeptidase 1 (LAP1) was also identified in two spots corresponding to a size of ~20 and ~30 kDa (Figure 4B, complex IV) and present after the first dimension in a protein band of about 500 kDa. These two spots could correspond to the two halves of the entire protein, which has a predicted size of 52 kDa. Interestingly, this protein is predicted to be able to form multimers (Gu *et al.* 1996), and it is noticeable on the second dimension that no major protein spots seems to correspond to a same initial complex (Figure 4B, complex IV) suggesting a



particularly high level of homo-multimerization of this protein. The second SDS-PAGE dimension reveals additional putative complexes. It evidences for instance a probable association between a lectin family protein (Curculin-like, At1g78850) and an  $\alpha$ -glucosidase (At5g11720) (Figure 4B, complex II). Lectins are known to exhibit ose-binding activities, and a specific association of this protein with a glycosyl hydrolase could define a functional entity able to recognize and hydrolyze particular sugars. Another potential complex is referred to as complex V in Figure 4B. It corresponds to a possible association between two serine proteases (At3g10450 and At3g14067), the size of the original complex in the first dimension suggesting an even higher level of association. At last, multiple proteins were identified as single spots in the second dimension, with an initial size in the first dimension higher than after denaturation. This likely indicates homo-multimerization of these proteins, such as for an  $\alpha$ -fucosidase (At2g28100, complex III, Figure 4B). Its size in native conditions corresponds to about 180 kDa, while after SDS-PAGE the spot migrates at about 58 kDa, suggesting a trimerization of this glycosidase and a subtilase family protein (At3g14067) that migrates in two different complexes.

### *III. Discussion*

---

Organelles purity after isolation is a critical aspect for subsequent mass spectrometry analysis, and requires particular attention when interpreting obtained results (Agrawal *et al.* 2011, Barkla *et al.* 2009). The procedures described in the present work allow isolation of intact vacuoles from a total cell lysate through purification on Ficoll gradients. The absence of contaminating material was previously assessed *via* western blot analyses of membrane proteins (Jaquinod *et al.* 2007), and is further confirmed in this work on soluble proteins, as deduced from the presented mass spectrometry results (Q-TOF, supplemental Table 1). It is indeed noticeable that none of the major proteins of the chloroplast such as the large subunit of the RuBisCO (AtCg00490), the  $\beta$  ATPase subunit (AtCg00480), or protein subunits of the photosystem I and II (At5g66570, At1g06680, At1g03130, At4g28750) were detected in our samples. Protein components of the glycine decarboxylase complex, corresponding to the major mitochondrial soluble proteins (Bardel *et al.* 2002, Douce *et al.* 2001), were also totally absent, as well as the At5g08690 mitochondrial ATPase subunit of the F1 domain, an abundant protein released after salt treatment of mitochondrial membranes (Millar *et al.* 2001). In addition, peroxisome contamination was evaluated by glycolate oxidase assays (Baker *et al.* 1966), for which no activity could be detected in vacuolar extracts (vs.  $250.5 \pm 10.6$  nmol of product/h/mg in protoplast total extracts, data not shown). It is noteworthy that

when protein identification was performed with the orbitrap mass spectrometer, certainly because of its high sensibility, we could identify several proteins known to be present in other cell compartments such as chloroplast or mitochondrion. Otherwise, several proteins known to be localized in the vacuole were retrieved, including numerous subunits of the vacuolar ATPase belonging to both V0 (membrane) and V1 (soluble) domains. This confirmed the enrichment of our vacuole extracts in vacuolar proteins, already verified by western blot using antibodies against Tonoplast Intrinsic Proteins and by activity measurement of  $\alpha$ -mannosidase (Jaquinod *et al.* 2007).

The hydrolase  $\alpha$ -mannosidase is a well known vacuolar protein involved in macromolecule recycling *via* hydrolysis of  $\alpha$ -D-mannose residues (Yoshihisa and Anraku 1990), which has been shown to be present under oligomeric form in *S. cerevisiae* (Hutchins and Klionsky 2001). We identified 5 members of this family (At3g26720, At5g13980, At5g66150, At3g21160 and At1g30000), suggesting a particularly high specificity of the vacuolar degradation / recycling machinery. In addition to these, 46 other glycosyl hydrolases (GH), corresponding to a total of 27 different GH families, were reported. This assumption of an important set of hydrolysis tools in the vacuole is also well evidenced by the identification of 75 proteases and proteases-related proteins (inhibitors, ubiquitin family protein ...), representing five catalytic types: aspartyl protease, cysteine proteinase, metalloproteinase, serine proteases and threonine peptidase. Some of them, such as three isoforms of VPE ( $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$ VPE) or 4 aspartyl-aminopeptidases (At1g62290, At1g03220, At3g13235, At1g11910), are known to be vacuolar (Hara-Nishimura *et al.* 1991, Hatsugai *et al.* 2004). When the soluble fraction were obtained in presence of salt wash, we particularly noticed the presence of 13 subunits belonging to the 20S proteasome core, their associated MASCOT score being relatively high ( $>80$ ) for most of them (Figure 5). Several other proteases present in our vacuole extract were also annotated as cytosolic proteins (Leucine aminopeptidase 1 & 3 ...), and we also observed the presence of 12 proteins of the glycolysis pathway (enolase, aldolase, triosephosphate isomerase, etc...) which occurs in the cytosol. The presence of such “contaminants” was in contradiction with the lack of any other obvious organelle contamination, and suggested 3 hypotheses that could explain their presence in association with the vacuole: (i) during vacuole purification, organelles could undergo lysis and disruption, leading to the formation of tonoplast vesicles containing large cytosol fractions. These vesicles would have been purified along with intact vacuoles, contaminating the vacuolar soluble fraction with cytosolic proteins; (ii) another possibility was that these proteins were actually remaining peptides from autophagic processes as it is suggested that autophagy occurs in protoplasts (Yano *et al.* 2007). In that case, cytosolic proteins that were



identified would have been internalized inside the vacuole for recycling. (iii) at last, it was also possible that these proteins were actually specifically bound to the vacuolar membrane, acting in some cytosolic-vacuolar pathway. This last supposition was mainly supported by the fact that several publications mention a role of the proteasome, for instance, in membrane movements, and especially tonoplast remodeling, at first in yeast (Kleijnen *et al.* 2007) and more recently in *Arabidopsis* (Hatsugai *et al.* 2009). The last hypothesis implies that these “cytosolic” proteins should not be retrieved without membrane salt wash, whereas vesicles formation or autophagy rather suggests that contaminants would be mainly present in the vacuolar sap. We therefore analyzed the soluble proteome of *Arabidopsis* vacuoles in absence of NaCl treatment of membranes, through a 2D IEF/SDS-PAGE analysis followed by nanoLC-MS/MS-based protein identification. The purpose of this approach was both to point out purely soluble proteins and to establish the first plant soluble vacuolar proteome map in order to get quantitative notions of this proteome organization. Using this method, a total of 102 proteins were identified from 152 resolved spots. This analysis led to the identification of 9 proteins that were not previously identified, this occurrence resulting from the lower protein complexity of a single spot compared to the previously performed “shotgun” analysis. As expected, this new dataset contained few proteins known or supposed to be membrane-bound – no subunits of the V-ATPase V0 domain was found – and was very enriched in soluble proteins such as proteases, glycosidases or peroxidases for instance. No proteasome subunit was identified in this soluble fraction after 2D electrophoresis, and most of the glycolysis-related enzymes (8 out of 12) were also missing. This absence of the proteasome in the soluble fraction was also confirmed by BN-PAGE analysis performed on that fraction, compared to the total extract. These observations were consistent with the assumption of an association of cytosolic proteins to the membrane of the vacuoles, not released in the soluble fraction when salt treatment was not performed. However some proteins of the cytosol, such as an enolase, some proteases (subtilase TPPII for instance), a glutathione S-transferase, or a 14-3-3 family protein for example, were still present in the 2D-cartography. Nonetheless, a non-specific contamination of the vacuoles by cytosolic fractions, whatever due to autophagy or vacuole lysis, would allow most abundant proteins of the cytosol to be detected first, and thus identified from the gel. Unfortunately, no proteomic survey of the cytosol of *Arabidopsis* had ever been published when we started our analyses. We therefore decided to engage a proteomic characterization aiming to identify most abundant proteins of the cytosol, and to see whether these proteins would be the major potential contaminants. We took advantage of our vacuole purification procedure, which allows organelles to be gently released from protoplasts to preserve vacuoles integrity, to collect a cytosol-enriched fraction from the

purification gradients. Subsequent proteomic analysis revealed that this fraction was indeed very pure, none of the previously mentioned major proteins of the chloroplast, the mitochondria, or the vacuole (PLAT/LH2 domain containing protein, peroxidases PER54, SOUL Heme-binding protein) being detected. This cytosol-enriched fraction was submitted to a two-dimensional IEF/SDS-PAGE analysis, and cytosol and vacuole cartographies subjected to comparison. Out of 153 proteins identified from 200 spots in the gel of cytosolic proteins, it turned out that only 13 were also present in the gel of vacuolar proteins, and that these were actually not the most represented ones. These results confirmed that the presence of contaminating proteins from the cytosol in our vacuolar fractions is mainly a “specific contamination” from non major cytosolic proteins. This highlights a specific interaction of the vacuolar membrane with a subset of cytosolic proteins, suggesting that these subcellular compartments are likely to be involved together in common metabolic processes, sharing some enzymes. Importantly, such a phenomenon has already been described in the mitochondrion, which appeared to be able to recruit enzymes of the glycolysis (Graham *et al.* 2007). The same pathway was later demonstrated to be involved in salt tolerance when associated to the tonoplast (Barkla *et al.* 2009), an interaction that was confirmed by our present results, at least for some enzymes, as well as by previous one (Jaquinod *et al.* 2007). In contrast, the presence of a cytosolic proteolytic pathway also connected to the vacuole was poorly documented in the literature, and was unexpected. A role for the ubiquitin-proteasome system in the vacuolar degradation of Ste6p, an ABC-type transporter, was demonstrated in *S. cerevisiae*, the authors suggesting a synergistic activity of the proteasome with vacuolar proteases of the lumen (Loayza and Michaelis 1998). An equivalent function in plants has never been demonstrated, even though a recent publication evidenced that the proteasome is required in membrane fusion events between tonoplast and plasma membrane in response to *P. syringae* and leading to PCD (Hatsugai *et al.* 2009). Our work also demonstrates that all the enzymes involved in the proteasome proteolytic pathway (20S proteasome subunits, TPPII, TOP, LAP 1, LAP3...) recently shown to be active in plants (Polge *et al.* 2009) are present on the surface of the tonoplast since they were also identified in the tonoplast compartment (Jaquinod *et al.* 2007) and are functional (Jarno *et al.*, in preparation) (Figure 5).

Analysis of the supramolecular organization of the vacuolar and vacuole-associated proteomes by BN-PAGE confirmed the presence of a single band containing 15 different subunits of the 20S proteasome core, together with 6 subunits of the 19S core (Jarno *et al.*, in preparation) (Villiers 2008). Analysis of the soluble fraction and western-blot experiments performed on different protein fractions corroborated the absence of the proteasome in the soluble fraction when this fraction was obtained without salt wash. Interestingly, native

electrophoresis also revealed the subtilisin TPPII as part of high molecular weight complex. This confirms that TPPII may be associated with the 20S proteasome core and has been identified in our work as one of the major vacuolar proteins in both the soluble fraction obtained with or without salt wash and in the membrane fraction (Jaquinod *et al.* 2007) (IEF/SDS-PAGE and BN-PAGE in present work & (Villiers 2008); Jarno *et al.*, in preparation) which could also suggest a double localization of TPPII, inside and outside the vacuole. Part of the pool would probably be free in the lumen while another fraction seems to be associated to the tonoplast. The identification of this protein in high molecular bands after native electrophoresis together with other proteins such as band 7 family proteins (thought to be able to regulate protein activities, (Kihara *et al.* 1996, Steglich *et al.* 1999) strongly suggests an interaction between them. The presence of several bands containing the same proteins indicates either different oligomerization degrees of a basic protein complex, or different possible stoichiometries between the components of the complex.

The vacuolar proteome also revealed the presence of 14 phosphatases. These proteins are known to be involved in a range of cellular processes, from phosphate homeostasis to signaling pathways. At least 4 different phosphatases can be involved in the later: A phospholipase D (At3g15730, supplemental Table 1, probably released from the membrane by salt wash) has for example been showed to positively regulate ABA signaling leading to stomatal closure in response to drought (Li *et al.* 2009). A phosphatase 2A regulatory subunit, RCN1 (At1g25490, supplemental Table 1), has also been identified in the vacuole, and is known to mediate ABA signaling as well (Kwak *et al.* 2002). A calcineurin (At5g55990, supplemental Table 1), and a phosphodiesterase (At4g29680) are also present in the soluble fraction, which could participate in mediating signal transduction even though their exact role in plants has not been established. The presence of several kinases (4), LRR-kinases (6) and *Ras*-related small GTP binding (5) is consistent with the assumption of the vacuole as an important site of signaling mediation has was suggested by other proteomic work (Endler *et al.* 2009, Whiteman *et al.* 2008a, Whiteman *et al.* 2008b).

Our work also revealed the presence of 4 acid phosphatases (At1g04040, At5g51260, At4g29260, At4g29270) and 8 purple acid phosphatases (supplemental Table 2). Their exact functions and specificity remain poorly known, particularly in plants, however they are assumed to take part in phosphate homeostasis, *via* the hydrolysis of phosphate esters and anhydrides (Duff *et al.* 1994, Olczak *et al.* 2003). The role of the vacuole in the regulation of phosphate availability is mainly described in yeast, where it has been demonstrated as particularly important. It has been shown that cytosolic phosphate remains constant under deprivation while the vacuolar pool decreases (Shirahama *et al.* 1996), and a highly selective

phosphate transport activity have been observed across the tonoplast of vacuoles isolated from *S. cerevisiae* (Booth and Guidotti 1997). Phosphate homeostasis in plant also requires the vacuole (De 2000, Pratt *et al.* 2009), even though less transporters have been identified. Our previous work, however, highlighted a glucose-6-phosphate/phosphate translocator in the tonoplast (Jaquinod *et al.* 2007). Phosphate transport across the tonoplast could actually be facilitated by its conjugation with a carbohydrate, as also suggested by the presence of a sucrose-phosphatase (At1g51420) in the soluble proteome of the vacuole.

The metabolism of glutathione (GSH) is also well represented through the identification of several enzymes involved in different GSH-dependant reactions. Glutathione is a tripeptide  $\gamma$ Glu-Cys-Gly, enzymatically synthesized, which participate in numerous detoxification processes in cells. For instance, its conjugation to heavy metals or toxic macromolecules such as xenobiotics like herbicides facilitates their recognition by transporters mediating their confinement or excretion (DeRidder *et al.* 2002). Enzymes in charge of this conjugation are the so-called glutathione *S*-transferases (Dixon *et al.* 2002), which 4 were identified in the soluble fraction isolated after salt wash and none without salt wash (At1g78380, At2g47730, At4g19880, At2g30870) suggesting that these GST are associated to the tonoplast (Figure 5). ABC- or MATE-type transporters are generally involved in the translocation of these GS-xenobiotic complexes across membranes, which respectively 14 and 5 were identified in the membrane fraction (Jaquinod *et al.* 2007). Inside the vacuole lumen, degradation of glutathione conjugates can occur *via* the  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase (GGT3/4, At4g29210) (Grzam *et al.* 2007, Ohkama-Ohtsu *et al.* 2007b), also identified in this work. The role of GSH in detoxification is also exemplified by the identification of a putative lactoylglutathione lyase / glyoxalase I, and a S-formylglutathione hydrolase, respectively involved in the detoxification of methylglyoxal (Thornalley 2003) and of formaldehyde (Kordic *et al.* 2002). Interestingly, GSH has been linked to signaling mediation, in part through the activity of some GST (Mullineaux *et al.* 2000). GSH ability to neutralize ROS, a known secondary messenger in cells (Gechev *et al.* 2006), is indeed proposed to regulate ROS-mediated signaling pathways. In addition, it is noticeable that a formaldehyde dehydrogenase, able to reduce S-nitrosoglutathione (GSNO, (Chen *et al.* 2009), has been identified in our work, further demonstrating the importance of signalling mediators proteins in – or linked to – the vacuole.

Further analyses aiming to precise the sub-organelle localization of these components of the vacuolar proteome has to be undertaken, but all together these data already suggest a cytosolic-vacuolar proteolytic pathway, as evoked by Loayza and co-workers (1998) in *S. cerevisiae*. Possible interactions between proteases and glycosidases are also suggested by

BN-PAGE studies, and high molecular weight complexes of  $\alpha$ -mannosidase or aspartyl-aminopeptidase in the soluble fraction, mentioned in the literature (Hutchins and Klionsky 2001, Lauterbach and Coetzer 2008) are confirmed by our work. But we moreover propose in this work that this pathway might include regulatory units (such as Band7 family protein), adjusting the metabolic flow linking the cytosol to the vacuole. This would imply a certain degree of communication, through signaling components, between these compartments. Interestingly, the vacuole soluble fraction analysis by IEF/SDS-PAGE 2D highlighted a Polycystin-1, Lipoxygenase, Alpha-Toxin (or Lipoxygenase Homology, PLAT/LH2) domain containing protein as the major soluble one in the vacuole. The role of these proteins has not been clearly determined so far, but it has been suggested that they could be involved in the production of oxylipins, important signalling molecules which first step of biosynthesis requires a lipoxygenase (Blee 2002). Signalling processes are also represented by several kinases, phosphatases or Ras-related proteins, which presence, in addition to numerous membrane-bound and integral membrane proteins previously identified (present work and (Jaquinod *et al.* 2007)), support the existence of trans-tonoplast signalling pathways. To our knowledge, this is the first time that such a communication network between the vacuole and the cytosol is evidenced, placing this organelle as an active player of the cellular metabolism able to undertake numerous essential tasks.

These new findings definitely prevent the vacuole from being any longer considered as a simple wasteland, where extra material is sent to clear up the cytosol. These results present this organelle in a new light, able to communicate with other components of the cell, probably from (and towards) the lumen, through the tonoplast. These signalling networks seem to be numerous, thus probably relatively specialized. They are thought to be required to regulate several vacuole-connected metabolic processes, which some have also been evidenced here. Deeper aspects of this organization are currently under investigation, and will precise and explore new functions of this organelle.

## Tables and Figures

**Table 1.** Compilation of the glycosyl hydrolases (GH) family proteins identified in the soluble compartment of *Arabidopsis thaliana* vacuoles.

Description	Glycoside hydrolase (GH) family	Locus	EC numbers	length	mass	pI	#pep.	score	coverage	SpC	Refs
Beta-glucosidase 16 (BGLU16)	GH1 ( $\beta$ -glucosidases / $\beta$ -galactosidases)	AT3G60130	EC 3.2.1.21	462	52 298.39	6.0	11	638	26.4	48	
Beta-glucosidase 10 (BGLU10)	GH1 ( $\beta$ -glucosidases / $\beta$ -galactosidases)	AT4G27830	EC 3.2.1.21	508	57 042.20	5.4	10	768	24.4	70	C
Beta-glucosidase 9 (BGLU9)	GH1 ( $\beta$ -glucosidases / $\beta$ -galactosidases)	AT4G27820	EC 3.2.1.21	506	56 855.98	5.4	6	425	14.6	21	
Beta-glucosidase 46 (BGLU46)	GH1 ( $\beta$ -glucosidases / $\beta$ -galactosidases)	AT1G61820	EC 3.2.1.21	516	59 075.26	6.4	3	143	6.8	4	
Beta-glucosidase 17 (BGLU17)	GH1 ( $\beta$ -glucosidases / $\beta$ -galactosidases)	AT2G44480	EC 3.2.1.21	517	59 083.24	5.6	3	294	9.5	5	
Beta-glucosidase 8 (BGLU8)	GH1 ( $\beta$ -glucosidases / $\beta$ -galactosidases)	AT3G62750	EC 3.2.1.21	497	56 142.62	5.8	2	134	4.8	29	C
Endo-beta-mannosidase (EBM), Mannosylglycoprotein	GH2	AT1G09010	EC 3.2.1.152	944	107 592.13	6.0	56	3790	52.5	274	C
Beta-galactosidase / lactase (Bgal)	GH2	AT3G54440	EC 3.2.1.-	1107	125 331.87	5.4	12	688	11.4	58	
Beta-D-xylosidase 6 (BXL6)	GH3	AT5G10560	EC 3.2.1.-	792	87 129.72	6.0	22	1448	26.6	154	C/J
Beta-D-glucan exohydrolase-like protein	GH3	AT3G47040	EC 3.2.1.-	636	69 605.48	5.1	12	775	20.4	22	
Beta-D-glucan exohydrolase-like protein	GH3	AT3G47000	EC 3.2.1.-	608	66 266.65	5.2	3	153	2.6	3	
Isoamylase-like protein (ISA3)	GH13	AT4G09020	EC 3.2.1.68	764	86 267.05	5.7	4	228	6.2	6	
Beta-amylase 5 (BAM5) / 1,4-alpha-D-glucan maltohydrolase	GH14	AT4G15210	EC 3.2.1.2	498	56 027.07	5.2	24	1610	56.2	89	
Beta-1, 3-glucanase class I	GH17	AT4G16260	EC 3.2.1.-	306	33 564.83	5.3	12	1058	41.8	64	J
Glucan endo-1,3-beta-glucosidase 5	GH17	AT4G31140	EC 3.2.1.39	484	52 681.83	5.8	3	200	12.2	3	S
Basic endochitinase B (CHI B)	GH19 (Chitinase class I subfamily)	AT3G12500	EC 3.2.1.14	322	34 586.33	6.8	12	1011	33.5	84	S/J
Hevein-like protein (HEL) (pathogenesis- related 4)	GH19	AT3G04720	EC 3.2.1.-	212	22 921.67	7.9	4	223	25.9	13	
Endochitinase isolog similar to chitinase class IV	GH19	AT2G43570	EC 3.2.1.-	277	29 755.97	5.8	2	132	7.9	6	
Beta-N-acetylhexosaminidase (HEXO1)	GH20	AT3G55260	EC 3.2.1.52	541	61 191.06	5.9	14	1079	24.6	182	C/S
Putative beta-hexosaminidase	GH20	AT1G05590	EC 3.2.1.-	580	64 949.93	5.9	3	149	5.5	3	
Alpha-D-galactosidase / melibiase	GH27 (alpha-galactosidase / melibiase)	AT3G56310	EC 3.2.1.-	437	48 331.56	4.7	13	865	33.2	264	C/S
Similarity to alpha galactosidase	GH27 (alpha-galactosidase / melibiase)	AT3G26380	EC 3.2.1.-	647	72 297.18	8.9	9	567	15.1	53	
Polygalacturonase / pectinase putative	GH28 (pectine lyase family)	AT3G16850	EC 3.2.1.-	455	49 093.64	5.5	17	1545	32.7	109	C
Uncharacterized polygalacturonase	GH28 (pectine lyase family)	AT3G57790	EC 3.2.1.-	490	54 064.48	4.8	10	614	16.1	32	J

Uncharacterized polygalacturonase	GH28 (pectine lyase family)	AT3G62110	EC 3.2.1.-	471	51 964.21	6.0	9	685	23.1	46	<b>C</b>
Polygalacturonase / pectinase putative	GH28 (pectine lyase family)	AT1G80170	EC 3.2.1.15	444	48 141.34	8.7	5	344	14.9	24	
Polygalacturonase / pectinase putative	GH28 (pectine lyase family)	AT5G49215	EC 3.2.1.-	447	48 542.05	5.4	5	321	9.8	55	
Uncharacterized polygalacturonase	GH28 (pectine lyase family)	AT3G06770	EC 3.2.1.-	377	40 782.44	6.0	4	258	14.1	14	
Pectate lyase/Amb allergen putative	GH28 (pectine lyase family)	AT3G09540	EC 3.2.1.-	378	41 443.65	8.2	2	89	6.1	4	
Alpha-L-fucosidase 1 (FUC1)	GH29	AT2G28100	EC 3.2.1.51	506	57 150.39	5.3	21	1525	34.2	330	<b>C</b>
Alpha-glucosidase 1 (AGLU1)	GH31	AT5G11720	EC 3.2.1.-	902	101 054.63	5.6	46	3317	42.2	394	<b>C/S</b>
Glucosidase II alpha subunit, alpha-glucosidase	GH31	AT5G63840	EC 3.2.1.-	921	104 208.78	5.9	27	1564	25.8	104	
Beta-fructofuranosidase, insoluble isoenzyme (CWINV3) / invertase/ fructan exohydrolase	GH32	AT1G55120	EC 3.2.1.80	594	67 025.39	5.5	10	611	18.5	21	<b>C</b>
Beta-fructosidase 3 (BFRUCT3) / beta-fructofuranosidase / invertase, vacuolar	GH32	AT1G62660	EC 3.2.1.26	648	72 183.06	5.3	2	128	4.5	4	<b>C</b>
Beta-fructofuranosidase (BFRUCT4) / invertase / saccharase	GH32	AT1G35580	EC 3.2.1.-	551	62 793.52	6.4	2	80	1.6	3	<b>S</b>
Beta-fructosidase 4 (BFRUCT4) / invertase	GH32	AT1G12240	EC 3.2.1.26	664	73 797.89	5.4	1	72	2.4	4	<b>C</b>
Putative sialidase	GH33	AT5G57700	EC 3.2.1.-	347	38 454.45	5.3	12	770	40.1	58	
Beta-galactosidase 9 (BGAL9) / lactase	GH35	AT2G32810	EC 3.2.1.23	887	99 135.27	8.3	35	2614	42.6	159	<b>C/S/J</b>
Trehalase putative	GH37	AT4G24040	EC 3.2.1.-	626	71 309.52	5.7	11	718	25.4	20	
Alpha-mannosidase lysosomal	GH38	AT3G26720	EC 3.2.1.-	1019	115 147.68	6.3	67	5066	50.1	422	<b>C/S/J</b>
Alpha-mannosidase	GH38	AT5G13980	EC 3.2.1.-	1024	115 829.57	6.0	50	3577	42.9	241	<b>C/J</b>
Alpha-mannosidase	GH38	AT5G66150	EC 3.2.1.-	1047	117 933.38	8.3	16	951	18.0	43	
Mannosyl-oligosaccharide 1,2-alpha-mannosidase 2 (MNS2)	GH47	AT3G21160	EC 3.2.1.113	572	65 094.93	6.1	16	1049	32.3	54	
Mannosyl-oligosaccharide 1,2-alpha-mannosidase 3 (MNS3)	GH47	AT1G30000	EC 3.2.1.113	624	69 025.39	6.6	13	788	29.8	26	
Mannosyl-oligosaccharide 1,2-alpha-mannosidase 1 (MNS1)	GH47	AT1G51590	EC 3.2.1.113	456	51 316.48	5.3	4	288	9.0	27	
Alpha-L-arabinofuranosidase 1 (ASD1)	GH51	AT3G10740	EC 3.2.1.55; 3.2.1.-	678	74 996.99	5.5	30	2308	38.5	167	<b>C</b>
Apospory-associated protein C (APOC)	GH65 (Aldose 1-epimerase)	AT4G25900	EC 3.2.1.-	318	36 229.17	9.7	5	350	21.1	21	
Heparanase-like protein 1	GH79	AT5G07830	EC 3.2.-.-	543	60 211.80	9.1	3	203	8.1	13	
Putative beta-glucan-elicitor receptor	GH81	AT5G15870	EC 3.2.1.-	745	82 820.58	6.2	4	206	8.6	7	
Similarity to endo-beta-N-acetylglucosaminidase putative	GH85	AT5G05460	EC 3.2.1.-	680	76 301.88	5.8	15	876	18.4	70	
Alpha-N-acetylglucosaminidase	GH89	AT5G13690	EC 3.2.1.-	806	92 629.84	7.3	15	948	20.7	51	<b>C</b>



This Table includes all GH identified in the soluble fraction referenced in the CAZy database and involved in hydrolysis and/or rearrangement of glycosidic bonds. Protein description, glycoside hydrolase family, AGI accession number (locus), enzyme classification number (EC number), protein length in amino acids (length), mass (Da), pI, number of identified peptides (#pep.), mascot score (score), coverage (in %) and spectral count (SpC) are given. Ref indicates GH identified by Carter et al (2004) (C), Shimaoka et al (2004) (S) and Jaquinod et al (2007) (J). Other proteomic works are not mentioned in the table since they did not lead to the identification of any vacuolar GH.



**Table 2.** Proteases and proteases-regulating proteins identified in the soluble compartments of *Arabidopsis thaliana* vacuoles

Description	Group	Locus	length	mass	pI	#pep.	score	coverage	SpC	Refs
<b>Aspartic peptidases</b>										
Uncharacterized Aspartyl protease	A1 (endopeptidases)	At1g11910	506	54 578.50	5.4	19	1325	46.0	150	C/S
Extracellular dermal glycoprotein putative (EDGP) aspartic-type endopeptidase activity	A1 (endopeptidases)	At1g03220	433	45 688.35	9.0	9	685	27.5	71	
Uncharacterized Aspartyl protease	A1 (endopeptidases)	At1g62290	513	55 712.79	6.0	9	525	24.0	34	C/S
Gamma-secretase subunit APH1-like	A22 (presenilin)	At2g31440	250	27 518.05	9.6	2	117	4.8	11	
Signal-peptide peptidase-3 (SPP3)	A22 (presenilin)	At2g43070	540	59 185.67	5.1	1	65	1.9	5	J
<b>Cysteine proteases</b>										
Cysteine proteinase, contains similarity to cysteine proteinase RD21A / Thiol protease	C1 (papain cysteine protease)	At3g19390	452	49 275.81	5.6	9	695	19.5	130	
Cathepsin B-like cysteine protease putative	C1 (papain cysteine protease)	At4g01610	359	39 319.16	5.9	10	772	23.4	127	
Cathepsin B-like cysteine protease putative	C1 (papain cysteine protease)	At1g02305	362	40 007.55	6.5	9	676	22.1	85	C/S
Cysteine proteinase putative	C1 (papain cysteine protease)	At3g19400	362	40 264.84	4.8	10	589	29.0	48	
Papain-like cysteine peptidase XBCP3	C1 (papain cysteine protease)	At1g09850	437	48 041.78	6.0	7	453	16.9	42	C
Cysteine proteinase / Thiol protease aleurain-like (AALP)	C1 (papain cysteine protease)	At3g45310	357	39 459.44	6.2	4	288	7.8	28	
Cysteine proteinase RD19A / Thiol protease	C1 (papain cysteine protease)	At4g39090	368	40 392.96	6.8	2	141	4.1	7	
Cysteine proteinase, contains similarity to cysteine proteinase RD21A / Thiol protease	C1 (papain cysteine protease)	At3g43960	376	41 514.69	5.1	4	186	11.2	5	
Cysteine proteinase (RD21A) / Thiol protease	C1A (papain)	At1g47128	462	50 933.43	5.3	14	1150	27.7	1098	C/S
Cysteine protease component of protease-inhibitor complex / thiol protease putative	C1A (papain)	At5g43060	463	51 170.57	5.9	13	914	21.2	342	S
Xylem cysteine proteinase 2 (XCP2)	C1A (papain)	At1g20850	356	39 682.41	5.2	4	303	16.9	39	
Cysteine proteinase / Thiol protease aleurain-like (AALP)	C1A (papain)	At5g60360	358	38 934.27	6.3	9	587	36.3	38	C
Xylem cysteine proteinase 1 (XCP1)	C1A (papain)	At4g35350	355	39 592.34	5.6	5	314	23.4	38	
Vacuolar processing enzyme gamma ( $\gamma$ -VPE)	C13 (legumain)	At4g32940	494	54 301.62	5.6	6	430	21.7	11	
Vacuolar-processing enzyme beta-isozyme ( $\beta$ -VPE)	C13 (legumain)	At1g62710	486	53 793.48	5.8	2	205	8.2	4	
Vacuolar processing enzyme alpha ( $\alpha$ -VPE)	C13 (legumain)	At2g25940	478	52 636.99	5.2	2	167	8.6	3	
Pyrrolidone-carboxylatePeptidase I (PGP-I)	C15 (pyroglutamyl peptidase)	At1g56700	219	24 031.20	6.0	7	471	27.9	26	
Ubiquitin-specific protease 12 (UBP12)	C19 (carboxyl-terminal hydrolase)	At3g11910	1115	130 566.60	5.4	4	279	5.0	10	
Gamma-glutamyl hydrolase (GGH2)	C26 (gamma-glutamyl hydrolase)	At1g78680	347	38 617.84	6.7	16	1116	41.5	65	C
Uncharacterized glutamyl-tRNA(Gln) amidotransferase putative	C26 (gamma-glutamyl hydrolase)	At5g07360	659	72 903.48	8.1	13	840	25.8	38	
Gamma-glutamyl hydrolase (GGH3)	C26 (gamma-glutamyl hydrolase)	At1g78670	352	39 857.00	5.9	8	514	26.7	29	C
Gamma-glutamyl hydrolase putative (GGH1)	C26 (gamma-glutamyl hydrolase)	At1g78660	348	39 032.48	5.6	5	381	22.4	17	

Metalloproteases										
Associated plasma membrane aminopeptidase M1 (APM1)	M1 (aminopeptidase)	At4g33090	879	98 116.85	5.3	12	731	18.3	14	
Alpha-aminoacylpeptide hydrolase putative	M1 (aminopeptidase N)	At1g63770	918	103 400.72	6.1	8	415	9.6	9	<b>S</b>
Uncharacterized Nicastrin-like component of gamma secretase complex	M9 (nicrastrin)	At3g52640	618	66 670.96	6.7	2	141	4.9	9	
Meprin and TRAF homology domain-containing protein	M12A (astacin)	At5g26280	350	39 421.19	8.5	16	1111	42.9	69	<b>S</b>
Meprin and TRAF homology domain-containing protein	M12A (astacin)	At3g20380	375	43 130.71	8.7	8	466	20.5	16	
Leucine aminopeptidase 1 (LAP1)	M17 (leucyl aminopeptidase)	At2g24200	520	54 475.01	5.7	27	2125	65.2	317	<b>S</b>
Leucine aminopeptidase 3 (LAP3)	M17 (leucyl aminopeptidase)	At4g30920	583	61 268.20	6.6	12	967	25.0	172	<b>S</b>
Leucine aminopeptidase 2 (LAP2)	M17 (leucyl aminopeptidase)	At4g30910	581	61 251.37	6.3	5	328	10.3	22	
Aspartyl aminopeptidase, zinc ion binding putative	M18 (aspartyl aminopeptidase)	At5g60160	477	52 392.26	6.3	25	1730	48.6	239	<b>S/J</b>
Aminopeptidase P, metallopeptidase	M24 (aminopeptidase P)	At4g36760	634	70 731.23	5.1	10	688	22.1	15	
Xaa-Pro dipeptidase / prolidase / imidodipeptidase / Proline dipeptidase	M24 (methionyl aminopeptidase)	At4g29490	333	37 756.33	5.1	4	231	20.1	5	
X-Pro dipeptidase-like protein	M24B (methionyl aminopeptidase P)	At4g29500	169	18 707.57	8.9	2	151	17.2	11	
Ileal peptidase like	M28 (methionyl aminopeptidase Y)	At5g19740	681	74 692.75	5.3	13	760	24.8	23	<b>S</b>
Protease-associated (PA) domain-containing protein	M28 (methionyl aminopeptidase Y)	At4g07670	280	31 095.89	5.1	2	106	10.0	3	
Dihydroorotase (DHOase / PYR4)	M38 (beta-aspartyl dipeptidase)	At4g22930	377	41 922.85	8.6	14	1012	50.1	26	
Cell division protease ftsH homolog 1 (FTSH1)	M41 (FtsH peptidase)	At1g50250	716	76 711.71	5.6	2	113	1.1	30	
Serine proteases										
Uncharacterized expressed protein	S5A (reductase)	At1g18180	292	33 619.99	9.2	2	122	2.7	4	
Tripeptidyl-peptidase II (TPPII)	S8A (subtilisin)	At4g20850	1380	152 272.72	5.8	81	6035	51.4	768	<b>C/S/J</b>
Subtilase protein, contains similarity to cucumisin-like serine protease	S8/S53 (subtilisin/sedolisin)	At3g14067	777	81 766.18	6.3	32	2577	44.0	824	<b>C/J</b>
Subtilase protein (ARA12), contains similarity to cucumisin-like serine protease (MAG2.15)	S8/S53 (subtilisin/sedolisin)	At5g67360	757	79 365.46	5.9	19	1520	27.3	68	
Subtilisin-like serine protease	S8 (subtilisin)	At2g05920	754	79 965.23	8.6	9	518	21.6	21	
Subtilisin-like serine protease putative	S8 (subtilisin)	At1g71950	136	14 842.51	5.8	2	109	19.1	3	
Prolyl oligopeptidase / endopeptidase	S9 (prolyl oligopeptidase)	At1g50380	710	80 887.28	5.5	40	2830	52.0	177	
Acylaminoacyl-peptidase (APH) protein	S9C (Acyl-peptide hydrolase)	At4g14570	764	83 884.83	5.6	24	1733	33.2	90	<b>S</b>
Prolyl oligopeptidase / endopeptidase	S9 (prolyl oligopeptidase)	At1g76140	795	89 348.11	5.5	19	1064	25.0	70	
TolB protein-related	S9B (kexin)	At4g01870	652	72 770.18	5.6	10	574	23.6	24	
Uncharacterized AXE 1 protein	S9 (prolyl oligopeptidase)	At5g25770	360	40 779.93	5.9	3	176	10.0	5	
Serine carboxypeptidase-like 7 (SCPL7)	S10 (serine carboxypeptidase)	At3g10450	394	45 000.13	6.2	18	1197	48.7	142	
Serine carboxypeptidase-like 50 (SCPL50)	S10 (serine carboxypeptidase)	At1g15000	444	49 191.12	5.4	19	1246	26.4	91	<b>C</b>
Serine carboxypeptidase-like 29 (SCPL29)	S10 (serine carboxypeptidase)	At4g30810	479	53 022.38	5.9	16	1184	28.8	67	<b>C</b>
Serine carboxypeptidase-like 49 (SCPL49)	S10 (serine carboxypeptidase)	At3g10410	516	57 264.59	5.2	16	934	29.5	67	<b>C/S</b>
Serine carboxypeptidase-like 26 (SCPL26)	S10 (serine carboxypeptidase)	At2g35780	452	51 488.59	6.4	16	1102	39.6	46	<b>C/S</b>
Serine carboxypeptidase-like 11 (SCPL11)	S10 (serine carboxypeptidase)	At2g22970	433	49 201.59	6.1	5	293	11.8	26	
Serine carboxypeptidase-like 20 (SCPL20)	S10 (serine carboxypeptidase)	At4g12910	484	54 194.14	5.9	8	475	19.4	24	<b>C</b>
Serine carboxypeptidase-like 48 (SCPL48)	S10 (serine carboxypeptidase)	At3g45010	510	56 859.39	5.3	2	167	5.7	6	
Serine carboxypeptidase-like 16	S10 (serine	At3g12220	435	49 205.56	6.0	2	129	4.4	3	

(SCPL16)	carboxypeptidase)									
<b>Serine carboxypeptidase S28 family protein</b>	S28 (serine carboxypeptidase)	At4g36195	488	54 739.17	6.1	22	1690	43.9	326	<b>C/S/J</b>
<b>Serine carboxypeptidase S28 family protein</b>	S28 (serine carboxypeptidase)	At4g36190	493	55 398.58	6.7	10	814	17.2	134	<b>C</b>
<b>Prolylcarboxypeptidase lysosomal (PRCP)</b>	S28 (proline carboxypeptidase)	At5g65760	515	58 535.66	5.3	19	1300	36.3	106	<b>C</b>
<b>Prolyl aminopeptidase-like protein</b>	S33 (prolyl aminopeptidase)	At3g61540	515	57 548.60	6.9	12	757	27.8	29	<b>S</b>
<b>Putative glutamate/ornithine acetyltransferase</b>	S58 (ArgJ)	At2g37500	468	48 682.93	6.2	2	106	6.2	6	
<b>Threonine proteases</b>										
<b>Uncharacterized expressed protein</b>	T2 (PGNase family protein (Peptide-N4-(N-acetyl-beta-glucosaminyl)asparagine amidase A))	At3g14920	609	68 953.04	6.3	18	1218	20.0	282	
<b>Uncharacterized expressed protein</b>	T2 (PGNase family protein (Peptide-N4-(N-acetyl-beta-glucosaminyl)asparagine amidase A))	At5g05480	608	68 391.90	5.4	12	829	26.2	139	
<b>Vacuolar Gamma-glutamyltransferase (GGT3)</b>	T3 (gamma-glutamyltransferase family)	At4g29210	637	69 104.14	5.8	22	1209	19.6	114	
<b>Protease activity regulators</b>										
<b>Kunitz_legume protein</b>	I3 (Kunitz trypsin inhibitor)	At1g17860	196	22 067.42	9.0	8	371	44.9	25	
<b>Kunitz_legume protein</b>	I3 (Kunitz trypsin inhibitor)	At3g04330	202	22 899.21	5.9	3	198	16.8	3	
<b>Serpin-ZX</b>	I4 (serpin family)	At1g47710	391	42 612.67	5.0	21	1296	51.9	63	
<b>Cysteine proteinase inhibitor 4 (cystatin 4)</b>	I25 (cysteine protease inhibitor, phytocystatin)	At4g16500	117	12 547.87	9.2	5	282	40.2	59	<b>C</b>

This Table includes all identified proteins in the soluble fraction referenced in the MEROPS database. They are classified according to their chemical mechanism of catalysis. Protein description, peptidase family, AGI accession number and mass spectrometry data (protein length, mass (Da), pI, number of identified peptides, mascot score, coverage and spectral count) are given. Ref indicates proteases identified by Carter et al (2004) (C), Shimaoka et al (2004) (S) and Jaquinod et al (2007) (J). Other proteomic works are not mentioned in the table since they did not lead to the identification of any vacuolar proteases.

**Table 3.** Twenty most important spots of the vacuolar 2D gel cartography (Figure 2), based on their quantification via PDQuest.

Spot	Relative intensity (%)	Locus	Description	MASCOT score
1	7,59	At4g39730	Lipid-associated family protein, contains PLAT/LH2domain	645,11
29	5,28	At5g06730	Peroxidase (PER54)	436,25
10	3,36	At1g17100	SOUL heme-binding family protein	359,82
17	2,97	At1g47128	* Cysteine proteinase (RD21A)	174,50
		At5g43060	* Cysteine proteinase, putative	56,71
7	2,46	At4g29260	Phosphatase acide (classe B)	334,63
9	2,31	At5g60360	* Cysteine proteinase, putative	50,49
		At4g29260	Phosphatase acide (classe B)	88,91
36	2,16	At3g55260	$\beta$ -N-acetylhexosaminidase 1 (GH, famille 20)	290,14
		At3g14067	* Subtilase	247,64
31	2,10	At4g29680	Phosphodiesterase	224,29
		At1g78900	⌘ VHA-A	175,51
18	2,09	At1g47128	* Cysteine proteinase (RD21A)	179,18
23	2,00	At3g26720	$\alpha$ -mannosidase (GH, famille 38)	279,24
		At1g78900	⌘ VHA-A	261,66
		At3g48700	Expressed protein	248,67
20	1,92	At4g01610	* Cysteine protease, putative	228,01
		At1g11910	* Aspartyl protease family protein (similar to pepsin A)	126,38
		At3g60340	Thioesterase	88,43
94	1,65	At5g43060	* Cysteine proteinase, putative	161,54
14	1,59	At1g14210	Ribonuclease (famille t2)	346,99
		At3g50440	Esterase, putative	70,84
		At5g34850	Calcineurin-like phosphoesterase	35,71
45	1,52	At1g55265	Expressed protein	46,99
19	1,49	At1g20260	⌘ VHA-B3	218,01
		At4g38510	⌘ VHA-B2	174,26
8	1,41	At1g17100	SOUL heme-binding family protein	403,75
27	1,40	At3g56310	$\alpha$ -galactosidase (GH, famille 27)	226,65
		At5g06730	Peroxidase, putative	169,68
148	1,37	At1g78900	⌘ VHA-A	799,96
16	1,32	At1g47128	* Cysteine proteinase (RD21A)	197,38
22	1,32	At4g30810	* Serine carboxypeptidase (famille S10)	110,85

**Table 4.** Twenty most important spots of the cytosol 2D gel cartography (Figure 3), based on their quantification via PDQuest.

Spot	Relative intensity (%)	Locus	Description	MASCOT score
28	3,84	At3g52930	Fructose-bisphosphate aldolase	530,96
10	2,71	At4g09320	Nucleoside diphosphate kinase 1 (NDK1)	409,51
27	2,69	At3g02230	Reversibly glycosylated polypeptide-1 (RGP1)	190,78
		At3g52930	Fructose-bisphosphate aldolase	204,92
34	2,49	At2g24200	Cytosol aminopeptidase	677,24
		At4g13940	Nascent polypeptide associated complex alpha chain protein	413,54
29	2,45	At1g79550	Phosphoglycerate kinase	534,65
		At5g17920	ATMETS	171,69
25	2,20	At1g35720	Annexin 1 (ANN1)	412,85
6	2,11	At5g42980	Thioredoxin H-type 3 (TRX-H-3)	356,74
28b	1,98	At1g04410	Malate dehydrogenase, cytosolic	366,49
22	1,94	At4g25100	Superoxide dismutase (Fe)	345,81
18	1,83	At3g55440	Triosephosphate isomerase	262,84
30	1,79	At1g79550	Phosphoglycerate kinase	358,56
31	1,76	At5g02500	Heat shock cognate (HSC70-1)	729,73
17	1,66	At3g55440	Triosephosphate isomerase	288,77
12	1,52	At5g38480	14-3-3 protein GF14 psi (GRF3)	177,68
		At5g02500	Heat shock cognate (HSC70-1)	202,37
		At1g47710	Serpin (serine protease inhibitor)	122,42
		At5g52640	Heat shock protein 81-1 (HSP81-1)	119,77
11	1,47	At5g56030	Heat shock protein 81-2 (HSP81-2)	462,03
15	1,44	At4g09000	14-3-3-like protein GF14 chi (GRF1)	257,53
		At5g10450	14-3-3 protein GF14 lambda (GRF6)	244,43
		At3g09440	heat shock cognate (HSC70-3)	121,88
21	1,36	At4g25100	Superoxide dismutase (Fe)	62,66
24	1,26	At1g35720	Annexin 1 (ANN1)	482,89
19	1,20	At2g30870	Glutathione S-transferase	343,56
		At1g78380	Glutathione S-transferase	108,41
71	1,18	At1g16890	Ubiquitin-conjugating enzyme	99,71
42	1,01	At5g17920	ATMETS	480,33

---

36	0,96	At1g12000	Pyrophosphate-fructose-6-phosphate	127,64
		At5g54960	Pyruvate decarboxylase putative	91,63
14	0,95	At4g09000	14-3-3-like protein GF14 chi (GRF1)	328,30
		At5g10450	14-3-3 protein GF14 lambda (GRF6)	359,02
		At3g09440	heat shock cognate (HSC70-3)	144,94
16	0,77	At1g22300	14-3-3 protein GF14 epsilon (GRF10)	277,25
		At5g65430	14-3-3 protein GF14 kappa (GRF8)	214,20
41	0,72	At5g17920	ATMETS	550,70
100	0,66	At2g31390	pfkB-type carbohydrate kinase	257,58
20	0,45	At1g78380	Glutathione S-transferase	320,35
		At2g30870	Glutathione S-transferase	124,41

---

## *Figures legends*

**Figure 1.** Strategy used for deciphering the vacuolar proteome.

Vacuoles were purified from *A. thaliana* suspension cultures using Ficoll gradients (A). After purification, vacuoles were broken and the soluble fraction was obtained in presence or in absence of salt (C). These soluble protein fractions were separated by a short SDS-PAGE migration, in-gel trypsin digested and peptides were separated by liquid chromatography prior to MS/MS analysis (D). The soluble vacuolar proteome was also analysed by 2D IEF/SDS-PAGE and compared to the cytosolic proteome (B). Blue Native (BN) PAGE and 2D BN/SDS-PAGE were performed to reach the protein complexes organisation of the vacuolar proteome (F).

**Figure 2.** The soluble protein 2-D gel map of vacuoles isolated from Arabidopsis cell culture.

Soluble proteins were prepared from Ficoll-gradient purified vacuoles and then separated by high-resolution 2-D electrophoresis. Proteins (175 µg) were separated according to their isoelectric point in the first dimension and by SDS-PAGE in the second dimension. The three gels performed (A, B & C).were calibrated for molecular mass (in kDa) and pI (in pH units) by internal standards. Spots of gel C were numbered (D), and proteins were identified by MALDI-TOF MS or ESI-MS/MS. These proteins are presented in supplemental Table 3 and the 20 major ones, numbered in red, are presented in Table 3. Gels were stained with R-250 Coomassie Brilliant Blue.

**Figure 3.** The 2-D gel map of the cytosolic proteome isolated from Arabidopsis cell culture.

Cytosolic soluble proteins were prepared from Ficoll-gradient according to the “Materials and methods” and then separated by high-resolution 2-D electrophoresis. The three gels (A, B & C).performed with 175 µg of proteins were calibrated for molecular mass and pI by internal standards. Spots of gel C were numbered (D), and proteins were identified by MALDI-TOF MS or ESI-MS/MS. These proteins are presented in supplemental Table 3 and the 20 major ones, numbered in red, are presented in Table 4. Gels were stained with R-250 Coomassie Brilliant Blue.

**Figure 4.** The supramolecular organization of the soluble proteome analyzed by BN-PAGE (A) and BN / SDS-PAGE (B).

Soluble vacuolar proteins (100 µg) were submitted to an electrophoresis under non-denaturing conditions on polyacrylamide gradient (5-13%) gel in presence of Coomassie blue G250 allowing the separation of proteins as complexes in the different visible bands and identified by MS (A). In order to analyze the composition of the proteins present in the different bands, a second dimension was performed (SDS-PAGE), gels were then silver stained and proteins identified by MS (B-C).

**Figure 5: Schematic of the plant vacuoles with distribution of proteins functions highlighted by proteomics.** Recycling and degradation of cellular components (glucosidase, proteases and specially those involved in the proteasome pathway present on the cytosolic site of the tonoplast...), energy, signalling/regulation, defence, metabolism, storage are the main functions illustrated.

**Supplemental Figure 1.** Comparison of proteome maps of the vacuolar soluble fraction and cytosol-enriched fraction. The 13 proteins common to both maps were given in the table, and spots where they have been identified are detailed in the table and on the figure.

### *Acknowledgments*

---

Ariane Atteia, June kwak



## References

- Agrawal, G.K., Bourguignon, J., Rolland, N., Ephritikhine, G., Ferro, M., Jaquinod, M., Konstantinos, G.A., Chardot, T., Chakraborty, N., Jolivet, P., Doonan, J.H. and Rakwal, R. (2011) Plant organelle proteomics: Collaborating for optimal cell function. *Mass Spectrom Rev*, **30**: 772-853.
- Ahn, Y.O., Zheng, M., Bevan, D.R., Esen, A., Shiu, S.H., Benson, J., Peng, H.P., Miller, J.T., Cheng, C.L., Poulton, J.E. and Shih, M.C. (2007) Functional genomic analysis of *Arabidopsis thaliana* glycoside hydrolase family 35. *Phytochemistry*, **68**, 1510-1520.
- Akaboshi, M., Hashimoto, H., Ishida, H., Saijo, S., Koizumi, N., Sato, M. and Shimizu, T. (2008) The crystal structure of plant-specific calcium-binding protein AtCBL2 in complex with the regulatory domain of AtCIPK14. *J Mol Biol*, **377**, 246-257.
- Akhtar, T.A., Orsomando, G., Mehrshahi, P., Lara-Nunez, A., Bennett, M.J., Gregory, J.F. and Hanson, A.D. (2010) A central role for gamma-glutamyl hydrolases in plant folate homeostasis. *Plant J.*, **64**, 256-266.
- Antao, C.M. and Malcata, F.X. (2005) Plant serine proteases: biochemical, physiological and molecular features. *Plant Physiol Biochem*, **43**, 637-650.
- Baker, A.L., Tolbert, N.E. and Willis, A.W. (1966) Glycolate oxidase (ferredoxin-containing form). In *Methods in Enzymology*: Academic Press, pp. 338-342.
- Bardel, J., Louwagie, M., Jaquinod, M., Jourdain, A., Lucche, S., Rabilloud, T., Macherel, D., Garin, J. and Bourguignon, J. (2002) A survey of the plant mitochondrial proteome in relation to development. *Proteomics*, **2**, 880-898.
- Barkla, B.J., Vera-Estrella, R., Hernandez-Coronado, M. and Pantoja, O. (2009) Quantitative Proteomics of the Tonoplast Reveals a Role for Glycolytic Enzymes in Salt Tolerance. *Plant Cell*, **21**, 4044-4058.
- Beers, E.P., Jones, A.M. and Dickerman, A.W. (2004) The S8 serine, C1A cysteine and A1 aspartic protease families in *Arabidopsis*. *Phytochemistry*, **65**, 43-58.
- Blee, E. (2002) Impact of phyto-oxylipins in plant defense. *Trends in Plant Science*, **7**, 315-321.
- Book, A.J., Yang, P.Z., Scalf, M., Smith, L.M. and Vierstra, R.D. (2005) Tripeptidyl peptidase II. An oligomeric protease complex from *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, **138**, 1046-1057.
- Booth, J.W. and Guidotti, G. (1997) Phosphate transport in yeast vacuoles. *J Biol Chem*, **272**, 20408-20413.
- Carter, C., Pan, S., Zouhar, J., Avila, E.L., Girke, T. and Raikhel, N.V. (2004) The vegetative vacuole proteome of *Arabidopsis thaliana* reveals predicted and unexpected proteins. *Plant Cell*, **16**, 3285-3303.
- Chen, R., Sun, S., Wang, C., Li, Y., Liang, Y., An, F., Li, C., Dong, H., Yang, X., Zhang, J. and Zuo, J. (2009) The *Arabidopsis* PARAQUAT RESISTANT2 gene encodes an S-nitrosoglutathione reductase that is a key regulator of cell death. *Cell Res*, **19**, 1377-1387.
- Coutinho, P.M. and Henrissat, B. (1999) Carbohydrate-active enzymes: An integrated database approach. In *Recent Advances in Carbohydrate Bioengineering* (Gilbert, H.J., Davies, G.J., Henrissat, B. and Svensson, B. eds), pp. 3-12.
- Davies, D.R. (1990) The structure and function of the aspartic proteinases. *Annu Rev Biophys Biophys Chem*, **19**, 189-215.
- De Coninck, B., Le Roy, K., Francis, I., Clerens, S., Vergauwen, R., Halliday, A.M., Smith, S.M., Van Laere, A. and Van den Ende, W. (2005) *Arabidopsis* AtcwINV3 and 6 are not invertases but are fructan exohydrolases (FEHs) with different substrate specificities. *Plant Cell Environ.*, **28**, 432-443.
- De, D.N. (2000) *Plant cell vacuoles: an introduction*.: CSIRO Publishing, Collingwood.
- DeRidder, B.P., Dixon, D.P., Beussman, D.J., Edwards, R. and Goldsbrough, P.B. (2002) Induction of glutathione S-transferases in *Arabidopsis* by herbicide safeners. *Plant Physiol.*, **130**, 1497-1505.
- Dixon, D.P., Laphorn, A. and Edwards, R. (2002) Plant glutathione transferases. *Genome Biology*, **3**.
- Douce, R., Bourguignon, J., Neuburger, M. and Rebeille, F. (2001) The glycine decarboxylase system: a fascinating complex. *Trends in Plant Science*, **6**, 167-176.
- Drozdowicz, Y.M. and Rea, P.A. (2001) Vacuolar H<sup>+</sup> pyrophosphatases: from the evolutionary backwaters into the mainstream. *Trends in Plant Science*, **6**, 206-211.
- Duff, S.M.G., Sarath, G. and Plaxton, W.C. (1994) The role of acid-phosphatase in plant phosphorus-metabolism. *Physiol. Plant.*, **90**, 791-800.
- Dunn, B.M. (2002) Structure and mechanism of the pepsin-like family of aspartic peptidases. *Chem Rev*, **102**, 4431-4458.
- Dupierriis, V., Masselon, C., Court, M., Kieffer-Jaquinod, S. and Bruley, C. (2009) A toolbox for validation of mass spectrometry peptides identification and generation of database: IRMa. *Bioinformatics*, **25**, 1980-1981.
- Emanuelsson, O., Brunak, S., von Heijne, G. and Nielsen, H. (2007) Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools. *Nat. Protoc.*, **2**, 953-971.

- Endler, A., Meyer, S., Schelbert, S., Schneider, T., Weschke, W., Peters, S.W., Keller, F., Baginsky, S., Martinoia, E. and Schmidt, U.G. (2006) Identification of a vacuolar sucrose transporter in barley and arabidopsis mesophyll cells by a tonoplast proteomic approach. *Plant Physiol.*, **141**, 196-207.
- Endler, A., Reiland, S., Gerrits, B., Schmidt, U.G., Baginsky, S. and Martinoia, E. (2009) In vivo phosphorylation sites of barley tonoplast proteins identified by a phosphoproteomic approach. *Proteomics*, **9**, 310-321.
- Frandsen, T.P. and Svensson, B. (1998) Plant alpha-glucosidases of the glycoside hydrolase family 31. Molecular properties, substrate specificity, reaction mechanism, and comparison with family members of different origin. *Plant Mol Biol*, **37**, 1-13.
- Fraser, C.M., Rider, L.W. and Chapple, C. (2005) An expression and bioinformatics analysis of the Arabidopsis serine carboxypeptidase-like gene family. *Plant Physiol*, **138**, 1136-1148.
- Funk, V., Kositsup, B., Zhao, C.S. and Beers, E.P. (2002) The Arabidopsis xylem peptidase XCP1 is a tracheary element vacuolar protein that may be a papain ortholog. *Plant Physiol.*, **128**, 84-94.
- Gechev, T.S., van Breusegem, F., Stone, J.M., Denev, I. and Laloi, C. (2006) Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death. *BioEssays*, **28**, 1091-1101.
- Graham, J.W.A., Williams, T.C.R., Morgan, M., Fernie, A.R., Ratcliffe, R.G. and Sweetlove, L.J. (2007) Glycolytic enzymes associate dynamically with mitochondria in response to respiratory demand and support substrate channeling. *Plant Cell*, **19**, 3723-3738.
- Grzam, A., Martin, M.N., Hell, R. and Meyer, A.J. (2007) gamma-glutamyl transpeptidase GGT4 initiates vacuolar degradation of glutathione S-conjugates in Arabidopsis. *FEBS Lett*, **581**, 3131-3138.
- Gu, Y.Q., Pautot, V., Holzer, F.M. and Walling, L.L. (1996) A Complex Array of Proteins Related to the Multimeric Leucine Aminopeptidase of Tomato. *Plant Physiol*, **110**, 1257-1266.
- Hara-Nishimura, I., Hatsugai, N., Nakaune, S., Kuroyanagi, M. and Nishimura, M. (2005) Vacuolar processing enzyme: an executor of plant cell death. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **8**, 404-408.
- Hara-Nishimura, I., Inoue, K. and Nishimura, M. (1991) A unique vacuolar processing enzyme responsible for conversion of several proprotein precursors into the mature forms. *FEBS Lett*, **294**, 89-93.
- Hatsugai, N., Iwasaki, S., Tamura, K., Kondo, M., Fuji, K., Ogasawara, K., Nishimura, M. and Hara-Nishimura, I. (2009) A novel membrane fusion-mediated plant immunity against bacterial pathogens. *Genes Dev.*, **23**, 2496-2506.
- Hatsugai, N., Kuroyanagi, M., Nishimura, M. and Hara-Nishimura, I. (2006) A cellular suicide strategy of plants: vacuole-mediated cell death. *Apoptosis*, **11**, 905-911.
- Hatsugai, N., Kuroyanagi, M., Yamada, K., Meshi, T., Tsuda, S., Kondo, M., Nishimura, M. and Hara-Nishimura, I. (2004) A plant vacuolar protease, VPE, mediates virus-induced hypersensitive cell death. *Science*, **305**, 855-858.
- Henrissat, B., Coutinho, P.M. and Davies, G.J. (2001) A census of carbohydrate-active enzymes in the genome of Arabidopsis thaliana. *Plant Mol.Biol.*, **47**, 55-72.
- Hrubá, P., Honys, D., Twell, D., Capkova, V. and Tupy, J. (2005) Expression of beta-galactosidase and beta-xylosidase genes during microspore and pollen development. *Planta*, **220**, 931-940.
- Hutchins, M.U. and Klionsky, D.J. (2001) Vacuolar localization of oligomeric alpha-mannosidase requires the cytoplasm to vacuole targeting and autophagy pathway components in Saccharomyces cerevisiae. *Journal of Biological Chemistry*, **276**, 20491-20498.
- Ishimizu, T., Sasaki, A., Okutani, S., Maeda, M., Yamagishi, M. and Hase, S. (2004) Endo-beta-mannosidase, a plant enzyme acting on N-glycan: purification, molecular cloning, and characterization. *J Biol Chem*, **279**, 38555-38562.
- Jaquinod, M., Villiers, F., Kieffer-Jaquinod, S., Hugouvieux, V., Bruley, C., Garin, J. and Bourguignon, J. (2007) A proteomics dissection of Arabidopsis thaliana vacuoles isolated from cell culture. *Mol Cell Proteomics*, **6**, 394-412.
- Ji, X.M., Van den Ende, W., Van Laere, A., Cheng, S.H. and Bennett, J. (2005) Structure, evolution, and expression of the two invertase gene families of rice. *J. Mol. Evol.*, **60**, 615-634.
- Kihara, A., Akiyama, Y. and Ito, K. (1996) A protease complex in the Escherichia coli plasma membrane: HflKC (HflA) forms a complex with FtsH (HflB), regulating its proteolytic activity against SecY. *Embo J*, **15**, 6122-6131.
- Kleijnen, M.F., Kirkpatrick, D.S. and Gygi, S.P. (2007) The ubiquitin-proteasome system regulates membrane fusion of yeast vacuoles. *Embo J*, **26**, 275-287.
- Kluge, C., Lahr, J., Hanitzsch, M., Bolte, S., Gollack, D. and Dietz, K.J. (2003) New insight into the structure and regulation of the plant vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, **35**, 377-388.
- Koizumi, M., Yamaguchi-Shinozaki, K., Tsuji, H. and Shinozaki, K. (1993) Structure and expression of two genes that encode distinct drought-inducible cysteine proteinases in Arabidopsis thaliana. *Gene*, **129**, 175-182.
- Kordic, S., Cummins, I. and Edwards, R. (2002) Cloning and characterization of an S-formylglutathione hydrolase from Arabidopsis thaliana. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **399**, 232-238.

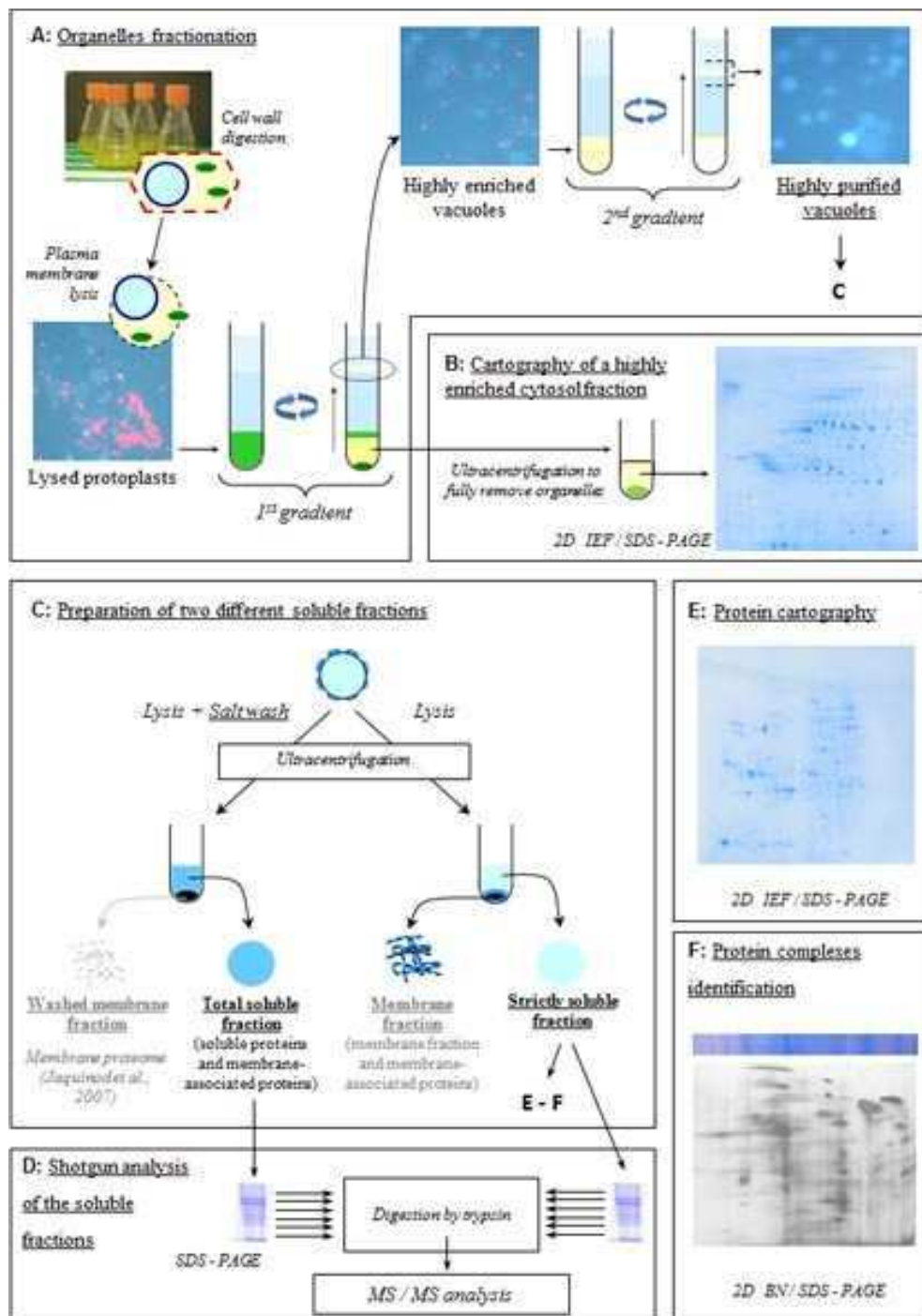
- Kuroyanagi, M., Yamada, K., Hatsugai, N., Kondo, M., Nishimura, M. and Hara-Nishimura, I.** (2005) Vacuolar processing enzyme is essential for mycotoxin-induced cell death in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry*, **280**, 32914-32920.
- Kwak, J.M., Moon, J.H., Murata, Y., Kuchitsu, K., Leonhardt, N., DeLong, A. and Schroeder, J.I.** (2002) Disruption of a guard cell-expressed protein phosphatase 2A regulatory subunit, RCN1, confers abscisic acid insensitivity in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **14**, 2849-2861.
- Lauterbach, S.B. and Coetzer, T.L.** (2008) The M18 aspartyl aminopeptidase of *Plasmodium falciparum* binds to human erythrocyte spectrin in vitro. *Malaria Journal*, **7**.
- Le Roy, K., Lammens, W., Verhaest, M., De Coninck, B., Rabijns, A., Van Laere, A. and Van den Ende, W.** (2007) Unraveling the difference between invertases and fructan exohydrolases: A single amino acid (Asp-239) substitution transforms *Arabidopsis* cell wall invertase1 into a fructan 1-exohydrolase. *Plant Physiol.*, **145**, 616-625.
- Li, M., Hong, Y. and Wang, X.** (2009) Phospholipase D- and phosphatidic acid-mediated signaling in plants. *Biochim Biophys Acta*, **1791**, 927-935.
- Loayza, D. and Michaelis, S.** (1998) Role for the ubiquitin-proteasome system in the vacuolar degradation of Ste6p, the  $\alpha$ -factor transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, **18**, 779-789.
- Luche, S., Diemer, H., Tastet, C., Chevallet, M., Van Dorsselaer, A., Leize-Wagner, E. and Rabilloud, T.** (2004) About thiol derivatization and resolution of basic proteins in two-dimensional electrophoresis. *Proteomics*, **4**, 551-561.
- Maeshima, M.** (2001) Tonoplast transporters: Organization and function. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol.*, **52**, 469-+.
- Martin, M.N., Saladores, P.H., Lambert, E., Hudson, A.O. and Leustek, T.** (2007) Localization of members of the gamma-glutamyl transpeptidase family identifies sites of glutathione and glutathione S-conjugate hydrolysis. *Plant Physiol.*, **144**, 1715-1732.
- Martinoia, E., Maeshima, M. and Neuhaus, H.E.** (2007) Vacuolar transporters and their essential role in plant metabolism. *J. Exp. Bot.*, **58**, 83-102.
- Marty, F.** (1999) Plant vacuoles. *Plant Cell*, **11**, 587-599.
- Millar, A.H., Sweetlove, L.J., Giege, P. and Leaver, C.J.** (2001) Analysis of the *Arabidopsis* mitochondrial proteome. *Plant Physiol.*, **127**, 1711-1727.
- Minic, Z.** (2008) Physiological roles of plant glycoside hydrolases. *Planta*, **227**, 723-740.
- Mullineaux, P., Ball, L., Escobar, C., Karpinska, B., Creissen, G. and Karpinski, S.** (2000) Are diverse signalling pathways integrated in the regulation of *Arabidopsis* antioxidant defence gene expression in response to excess excitation energy? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **355**, 1531-1540.
- Narvaez-Vasquez, J., Tu, C.J., Park, S.Y. and Walling, L.L.** (2008) Targeting and localization of wound-inducible leucine aminopeptidase A in tomato leaves. *Planta*, **227**, 341-351.
- Neuhaus, H.E.** (2007) Transport of primary metabolites across the plant vacuolar membrane. *Febs Letters*, **581**, 2223-2226.
- Neuhoff, V., Arold, N., Taube, D. and Ehrhardt, W.** (1988) Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis*, **9**, 255-262.
- Ohkama-Ohtsu, N., Radwan, S., Peterson, A., Zhao, P., Badr, A.F., Xiang, C.B. and Oliver, D.J.** (2007a) Characterization of the extracellular gamma-glutamyl transpeptidases, GGT1 and GGT2, in *Arabidopsis*. *Plant J.*, **49**, 865-877.
- Ohkama-Ohtsu, N., Zhao, P., Xiang, C.B. and Oliver, D.J.** (2007b) Glutathione conjugates in the vacuole are degraded by gamma-glutamyl transpeptidase GGT3 in *Arabidopsis*. *Plant J.*, **49**, 878-888.
- Olczak, M., Morawiecka, B. and Watorek, W.** (2003) Plant purple acid phosphatases - genes, structures and biological function. *Acta Biochimica Polonica*, **50**, 1245-1256.
- Orsomando, G., de la Garza, R.D., Green, B.J., Peng, M., Rea, P.A., Ryan, T.J., Gregory, J.F., 3rd and Hanson, A.D.** (2005) Plant gamma-glutamyl hydrolases and folate polyglutamates: characterization, compartmentation, and co-occurrence in vacuoles. *J Biol Chem*, **280**, 28877-28884.
- Peng, J.M., Elias, J.E., Thoreen, C.C., Licklider, L.J. and Gygi, S.P.** (2003) Evaluation of multidimensional chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC/LC-MS/MS) for large-scale protein analysis: The yeast proteome. *Journal of Proteome Research*, **2**, 43-50.
- Plancke, Y., Dautrevaux, M. and Biserte, G.** (1978) Human serum hemopexin: direct evidence for change of its isoelectric point upon heme binding. A new serum protein fractionation. *Biochimie*, **60**, 171-175.
- Plancke, Y., Dautrevaux, M. and Biserte, G.** (1977) Change of human hemopexin isoelectric point upon heme binding. *FEBS Lett*, **78**, 291-294.
- Polge, C., Jaquinod, M., Holzer, F., Bourguignon, J., Walling, L. and Brouquisse, R.** (2009) Evidence for the Existence in *Arabidopsis thaliana* of the Proteasome Proteolytic Pathway ACTIVATION IN RESPONSE TO CADMIUM. *Journal of Biological Chemistry*, **284**, 35412-35424.

- Prak, S., Hem, S., Boudet, J., Viennois, G., Sommerer, N., Rossignol, M., Maurel, C. and Santoni, V. (2008) Multiple phosphorylations in the C-terminal tail of plant plasma membrane aquaporins. *Mol. Cell. Proteomics*, **7**, 1019-1030.
- Pratt, J., Boisson, A.M., Gout, E., Bligny, R., Douce, R. and Aubert, S. (2009) Phosphate (Pi) Starvation Effect on the Cytosolic Pi Concentration and Pi Exchanges across the Tonoplast in Plant Cells: An in Vivo P-31-Nuclear Magnetic Resonance Study Using Methylphosphonate as a Pi Analog. *Plant Physiol.*, **151**, 1646-1657.
- Rabilloud, T., Adessi, C., Giraudel, A. and Lunardi, J. (1997) Improvement of the solubilization of proteins in two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis*, **18**, 307-316.
- Rabilloud, T., Valette, C. and Lawrence, J.J. (1994) Sample application by in-gel rehydration improves the resolution of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients in the first dimension. *Electrophoresis*, **15**, 1552-1558.
- Rautengarten, C., Steinhäuser, D., Bussis, D., Stintzi, A., Schaller, A., Kopka, J. and Altmann, T. (2005) Inferring hypotheses on functional relationships of genes: Analysis of the *Arabidopsis thaliana* subtilase gene family. *PLoS Comput Biol*, **1**, e40.
- Rawlings, N.D. and Barrett, A.J. (1995) Families of aspartic peptidases, and those of unknown catalytic mechanism. *Methods Enzymol*, **248**, 105-120.
- Rawlings, N.D., Morton, F.R., Kok, C.Y., Kong, J. and Barrett, A.J. (2008) MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res*, **36**, D320-325.
- Rea, P.A. (2007) Plant ATP-Binding cassette transporters. *Annu. Rev. Plant Biol.*, **58**, 347-375.
- Ruepp, A., Zollner, A., Maier, D., Albermann, K., Hani, J., Mokrejs, M., Tetko, I., Guldener, U., Mannhaupt, G., Münsterkötter, M. and Mewes, H.W. (2004) The FunCat, a functional annotation scheme for systematic classification of proteins from whole genomes. *Nucleic Acids Research*, **32**, 5539-5545.
- Sanchez, J.E., Kuhn, L., Ducruix, C., Lafaye, A., Junot, C., Hugouvieux, V., Jourdain, A., Bastien, O., Fievet, J.B., Vailhen, D., Amekraz, B., Moulin, C., Ezan, E., Garin, J. and Bourguignon, J. (2006) The early responses of *Arabidopsis thaliana* cells to cadmium exposure explored by protein and metabolite profiling analyses. *Proteomics*, **6**, 2180-2198.
- Sazuka, T., Keta, S., Shiratake, K., Yamaki, S. and Shibata, D. (2004) A proteomic approach to identification of transmembrane proteins and membrane-anchored proteins of *Arabidopsis thaliana* by peptide Sequencing. *DNA Research*, **11**, 101-113.
- Schagger, H. and von Jagow, G. (1991) Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal Biochem*, **199**, 223-231.
- Schaller, A. (2004a) A cut above the rest: the regulatory function of plant proteases. *Planta*, **220**, 183-197.
- Schaller, A. (2004b) A cut above the rest: the regulatory function of plant proteases. *Planta*, **220**, 183-197.
- Schmidt, U.G., Endler, A., Schelbert, S., Brunner, A., Schnell, M., Neuhaus, H.E., Marty-Mazars, D., Marty, F., Baginsky, S. and Martinoia, E. (2007) Novel tonoplast transporters identified using a proteomic approach with vacuoles isolated from cauliflower buds. *Plant Physiol.*, **145**, 216-229.
- Schneider, T., Schellenberg, M., Meyer, S., Keller, F., Gehrig, P., Riedel, K., Lee, Y., Eberl, L. and Martinoia, E. (2009) Quantitative detection of changes in the leaf-mesophyll tonoplast proteome in dependency of a cadmium exposure of barley (*Hordeum vulgare* L.) plants. *Proteomics*, **9**, 2668-2677.
- Schumacher, K. and Krebs, M. (2010) The V-ATPase: small cargo, large effects. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **13**, 724-730.
- Shimada, T., Yamada, K., Kataoka, M., Nakaune, S., Koumoto, Y., Kuroyanagi, M., Tabata, S., Kato, T., Shinozaki, K., Seki, M., Kobayashi, M., Kondo, M., Nishimura, M. and Hara-Nishimura, I. (2003) Vacuolar processing enzymes are essential for proper processing of seed storage proteins in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem*, **278**, 32292-32299.
- Shimaoka, T., Ohnishi, M., Sazuka, T., Mitsuhashi, N., Hara-Nishimura, I., Shimazaki, K., Maeshima, M., Yokota, A., Tomizawa, K. and Mimura, T. (2004) Isolation of intact vacuoles and proteomic analysis of tonoplast from suspension-cultured cells of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol*, **45**, 672-683.
- Shirahama, K., Yazaki, Y., Sakano, K., Wada, Y. and Ohsumi, Y. (1996) Vacuolar function in the phosphate homeostasis of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Plant Cell Physiol*, **37**, 1090-1093.
- Simoes, I. and Faro, C. (2004) Structure and function of plant aspartic proteinases. *Eur J Biochem*, **271**, 2067-2075.
- Steglich, G., Neupert, W. and Langer, T. (1999) Prohibitins regulate membrane protein degradation by the m-AAA protease in mitochondria. *Mol Cell Biol*, **19**, 3435-3442.
- Strasser, R., Bondili, J.S., Schoberer, J., Svoboda, B., Liebminger, E., Glossl, J., Altmann, F., Steinkellner, H. and Mach, L. (2007) Enzymatic properties and subcellular localization of *Arabidopsis* beta-N-acetylhexosaminidases. *Plant Physiol*, **145**, 5-16.
- Sze, H., Li, X.H. and Palmgren, M.G. (1999) Energization of plant cell membranes by H<sup>+</sup>-pumping ATPases: Regulation and biosynthesis. *Plant Cell*, **11**, 677-689.
- Sze, H., Schumacher, K., Muller, M.L., Padmanaban, S. and Taiz, L. (2002) A simple nomenclature for a complex proton pump: VHA genes encode the vacuolar H<sup>(+)</sup>-ATPase. *Trends Plant Sci*, **7**, 157-161.

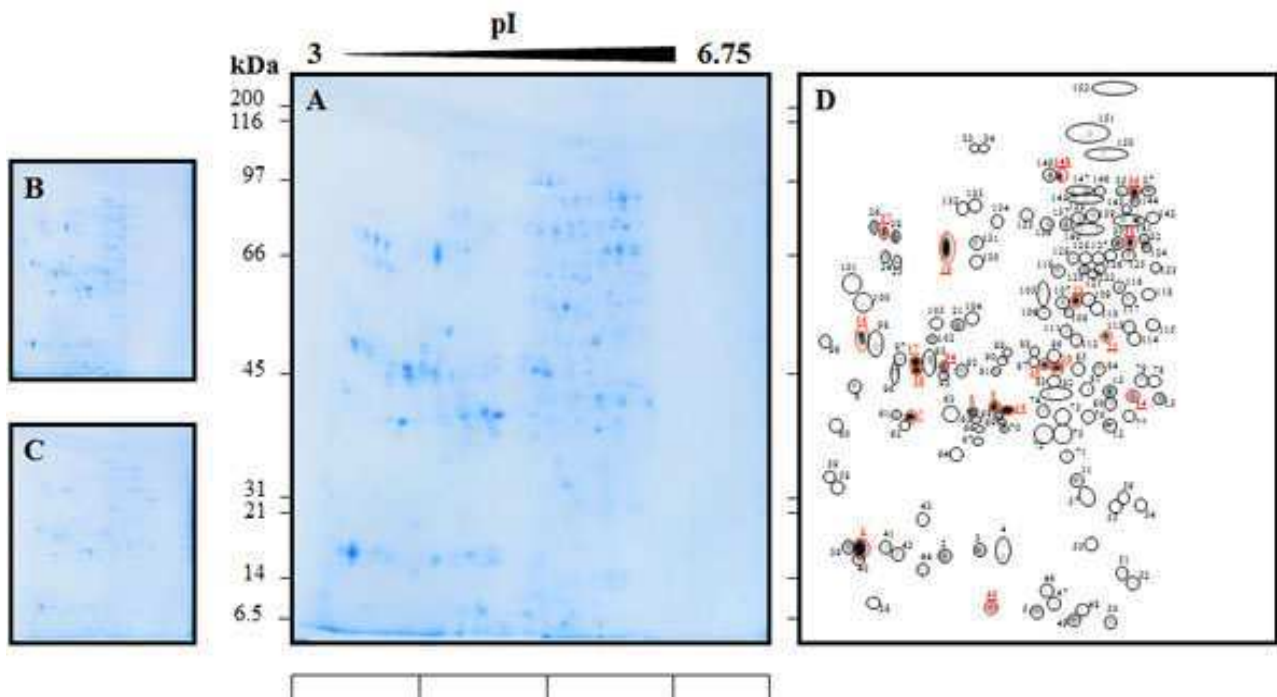


- Thornalley, P.J.** (2003) Glyoxalase I - structure, function and a critical role in the enzymatic defence against glycation. *Biochem. Soc. Trans.*, **31**, 1343-1348.
- van der Hoorn, R.A.L.** (2008) Plant proteases: From phenotypes to molecular mechanisms. *Annu. Rev. Plant Biol.*, **59**, 191-223.
- Villiers, F.** (2008) Etude protéomique des vacuoles d'*Arabidopsis thaliana*, en vue de l'identification d'acteurs protéiques impliqués dans la detoxication du cadmium. *PhD, Université Joseph Fourier*.
- Walling, L.L.** (2006) Recycling or regulation? The role of amino-terminal modifying enzymes. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **9**, 227-233.
- Whiteman, S.A., Nuhse, T.S., Ashford, D.A., Sanders, D. and Maathuis, F.J.M.** (2008a) A proteomic and phosphoproteomic analysis of *Oryza sativa* plasma membrane and vacuolar membrane. *Plant J.*, **56**, 146-156.
- Whiteman, S.A., Serazetdinova, L., Jones, A.M.E., Sanders, D., Rathjen, J., Peck, S.C. and Maathuis, F.J.M.** (2008b) Identification of novel proteins and phosphorylation sites in a tonoplast enriched membrane fraction of *Arabidopsis thaliana*. *Proteomics*, **8**, 3536-3547.
- Wisniewski, K. and Zagdanska, B.** (2001) Genotype-dependent proteolytic response of spring wheat to water deficiency. *J Exp Bot*, **52**, 1455-1463.
- Yano, K., Haffori, M. and Moriyasu, Y.** (2007) A novel type of autophagy occurs together with vacuole genesis in miniprotoplasts prepared from tobacco culture cells. *Autophagy*, **3**, 215-221.
- Yoshihisa, T. and Anraku, Y.** (1990) A novel pathway of import of alpha-mannosidase, a marker of vacuolar membrane, in *saccharomyces-cerevisiae*. *J Biol Chem*, **265**, 22418-22425.

# Figure 1



**Figure 2**



**Figure 3**

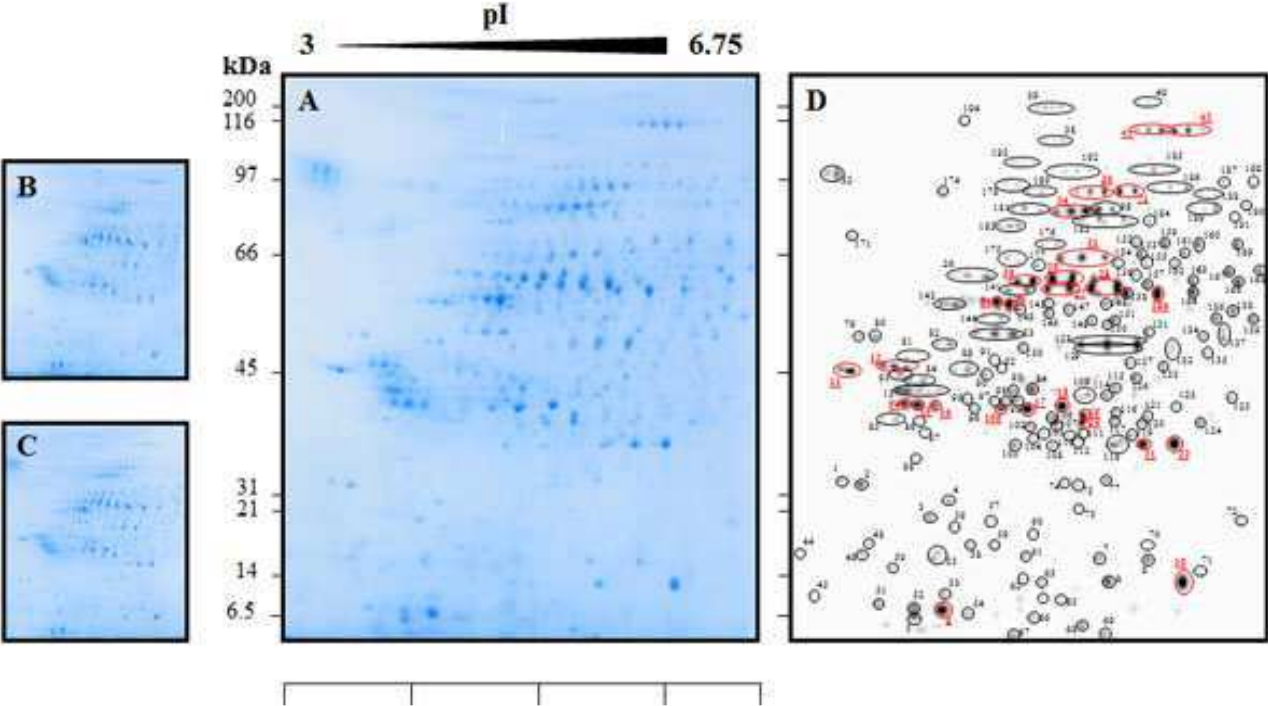




Figure 4

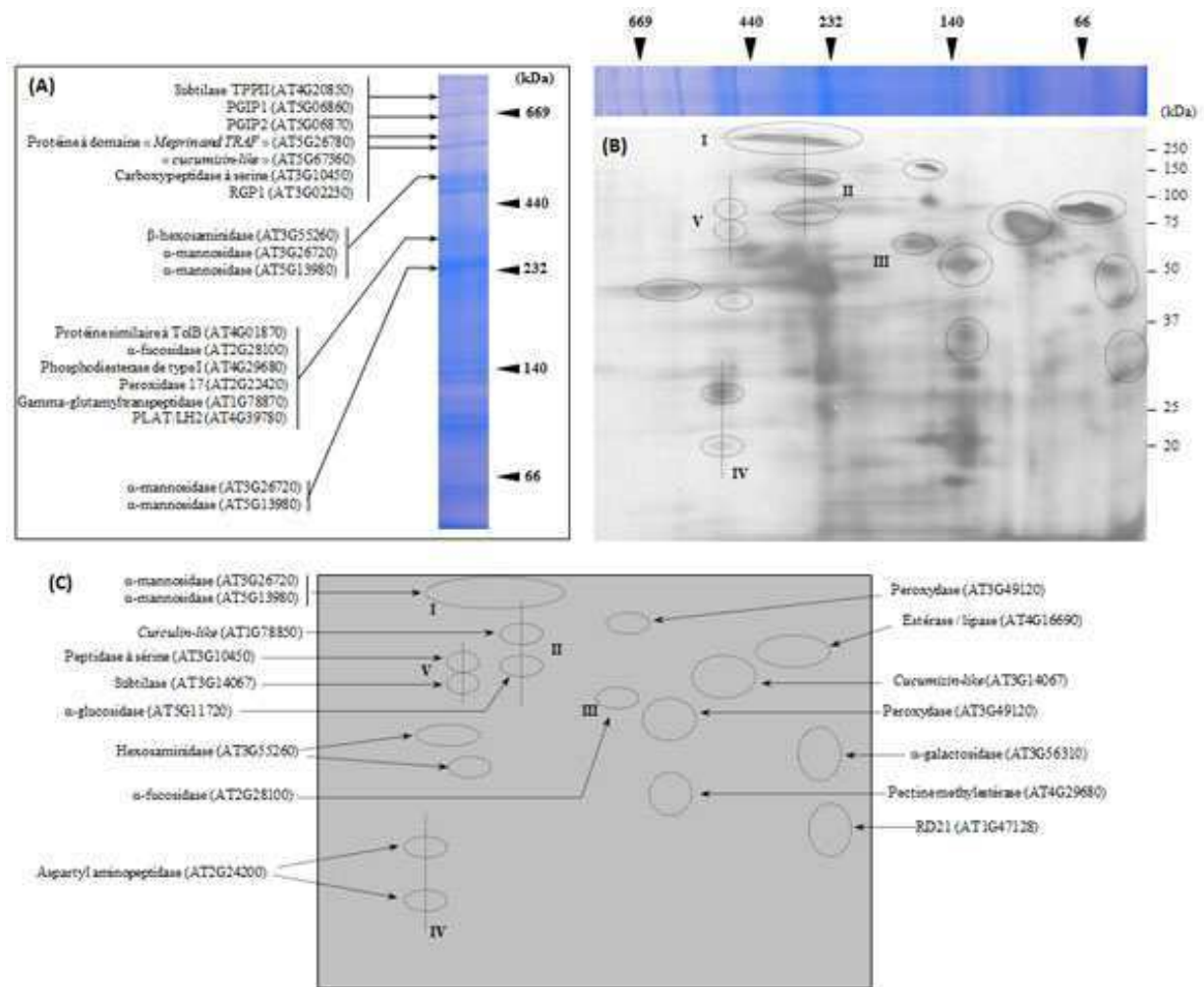
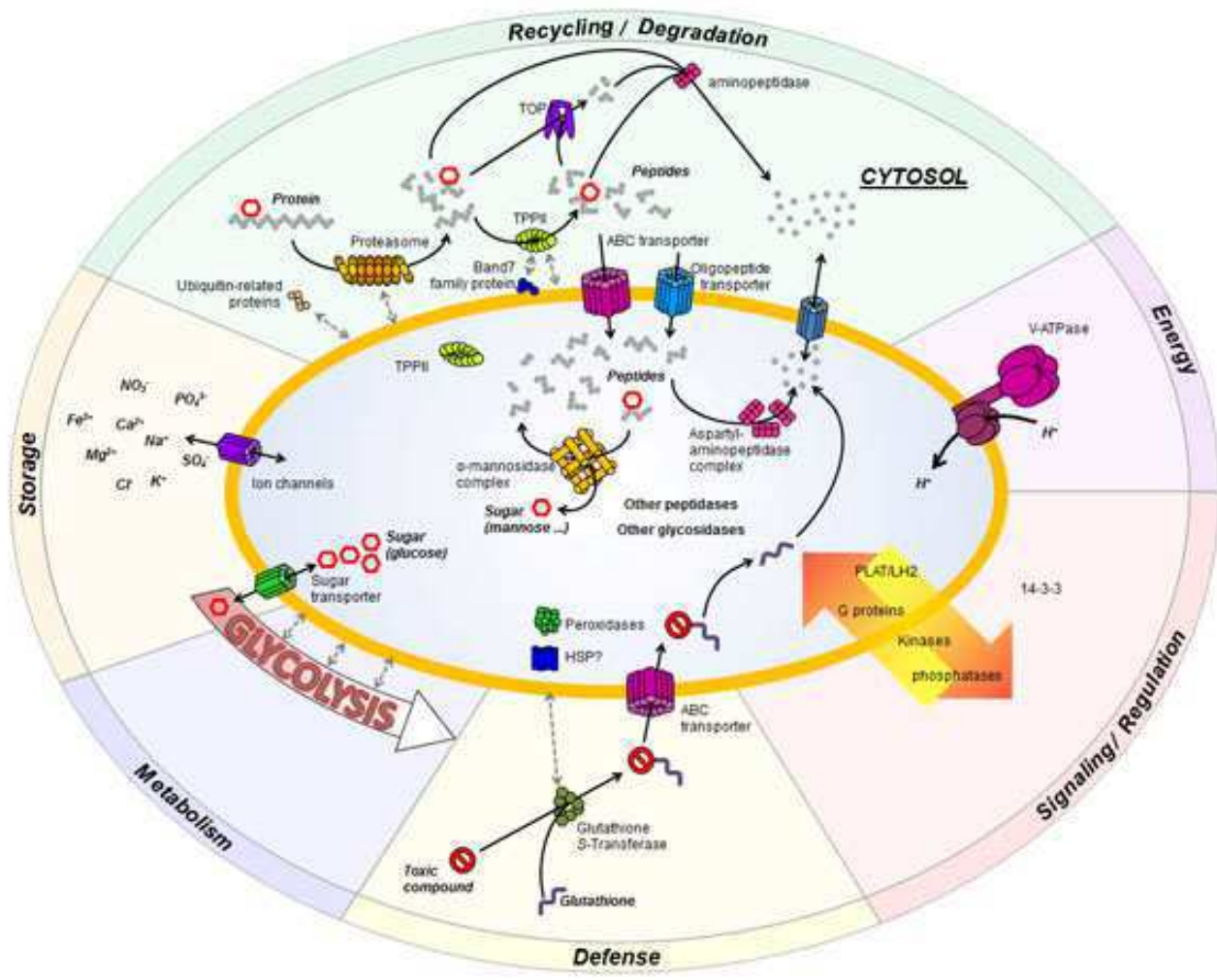
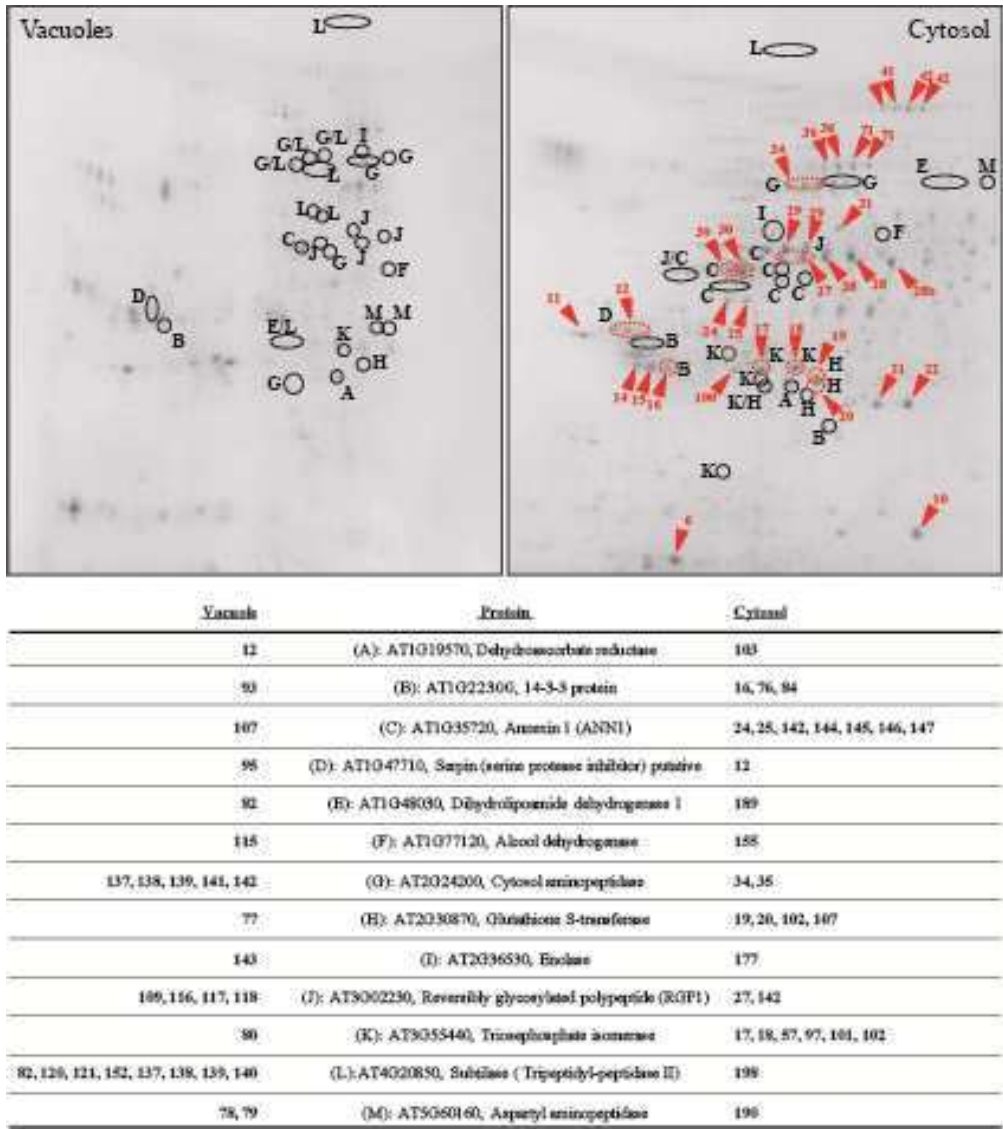


Figure 5



Supplemental Figure 1



### ***III - Conclusion chapitre 1***

L'amélioration du protocole de purification de vacuoles de cellules d'*Arabidopsis thaliana* a permis d'obtenir des vacuoles dans un état de pureté satisfaisant pour poursuivre les études protéomiques. Le suivi du rendement des préparations a été réalisé par des mesures de l'activité d'une enzyme spécifique de la vacuole ( $\alpha$ -mannosidase).

Dans une première partie, mon travail a consisté à analyser les résultats des identifications issues des cartographies (IEF/SDS-PAGE) vacuolaires et cytosoliques afin de les comparer. Pour la première fois une cartographie du protéome soluble vacuolaire d'*Arabidopsis thaliana* a été établie. À partir des 187 spots analysés, 99 protéines non redondantes ont pu être identifiées, un nombre important de celles-ci appartient aux classes des peptidases et glycosidases. Sur 187 spots analysés, 87 spots (47 %) correspondent à ces deux classes de protéines. D'autres protéines ne présentant pas de fonction définie ont également été identifiées. Parmi celles-ci la SOUL HBP, la PLAT LH2, TPP II, la *gamma* Glutamyl Transpeptidase (GGT3) pourraient faire l'objet d'études plus approfondies. La comparaison des deux cartographies de profil très différent n'a mis en évidence que 13 protéines en commun. De manière générale, la plupart des spots majoritaires du cytosol ne sont pas présents dans la cartographie du protéome vacuolaire. Or, si les vacuoles étaient contaminées de manière non spécifique par des protéines cytosoliques, la plupart des protéines majoritaires de la cartographie du cytosol devrait être retrouvée sur celle du protéome soluble de la vacuole.

Une seconde partie de mon travail a été d'initier une étude de la composition supramoléculaire des protéines solubles vacuolaires par la réalisation de gels bidimensionnels de type BN/SDS-PAGE. Des complexes protéiques solubles putatifs ont ainsi pu être mis en évidence. Il paraît primordial de poursuivre cette caractérisation du protéome vacuolaire d'*Arabidopsis thaliana* par d'autres approches visant à caractériser ces complexes.

Le troisième volet de mon travail de thèse a été d'entamer une caractérisation approfondie du protéome soluble. Pour cela une centaine d'analyses nanoLC-MS/MS ont été réalisées sur un Orbitrap. Toutes les analyses ont été regroupées dans une base de données dédiée la MSIDB Vacuole\_Soluble. Les analyses protéomiques de la fraction soluble réalisées au cours de ce travail ont permis l'identification de 504 protéines (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.** - Protéothèque). Les classes fonctionnelles mises en évidences concordent et recouvrent les fonctions physiologiques décrites pour être vacuolaire. La fouille des données révélant que certaines protéines étaient attribuées à d'autres organites ou au cytosol, nous a poussées à approfondir la question de la spécificité du contenu vacuolaire.

Le quatrième et dernier volet de mon travail de caractérisation du protéome soluble a donc consisté à mettre en place les expériences de « Shave and Conquer ». Afin d'aller plus loin dans la compréhension des mécanismes conduisant à la présence de contaminants cytosoliques dans la vacuole, des travaux supplémentaires visant à discriminer les protéines luminales et associées à la vacuole du côté cytosolique du tonoplaste ont été initiés. Ceux-ci consistent à réaliser une digestion par la protéinase K de vacuoles intactes afin de dégrader les protéines de la face externe des organites (Expérience de « *Shave and Conquer* »). Les vacuoles ainsi « rasées » sont alors purifiées une nouvelle fois sur gradient de densité afin d'éliminer les peptides externes protéolysés, puis analysées par spectrométrie de masse. Les résultats sont alors comparés avec ceux obtenus à partir d'échantillons vacuolaires non soumis à l'action de la protéinase K. Ces analyses ont conduit à l'identification de protéines présentes dans les fractions solubles et membranaires de chacun des échantillons de vacuoles (traitées ou non à la protéinase K). Cette analyse, moins exhaustive que celle réalisée en shot gun, a été faite de manière à mettre en évidence la « disparition » ou l'enrichissement de protéines suite à l'incubation des organites intactes avec la protéase. Cette étude de protection à la protéinase K réalisée en triplicata sur des séries de préparations de vacuoles (3 préparations groupées à chaque fois) permet d'ores et déjà de mettre en évidence quelques aspects de l'organisation des protéines dans, ou associées à, la vacuole. Leurs résultats suggèrent que les protéines « cytosoliques » sont sans doute fonctionnelles à l'intérieur de la vacuole ou en cours de dégradation.

Le travail effectué sur le protéome soluble ouvre plusieurs perspectives. L'analyse protéomique, *via* la réalisation d'électrophorèse bidimensionnelle, permet d'étudier l'expression des protéines et de suivre les variations quantitatives et qualitatives de cette expression au cours de divers processus cellulaires. L'évolution du patron d'expression du protéome soluble de la vacuole au cours d'un stress cadmium (ou de toutes autres variations physiologiques) fait partie des travaux que nous avons souhaité approfondir (Chapitre III).

De plus, l'analyse des gels 2D permet de mettre en évidence les différentes formes protéiques issues de phénomènes de régulations post-traductionnelles comme la phosphorylation, la glycosylation ou les clivages protéolytiques. Ces modifications changent les paramètres physico-chimiques de la protéine et sont détectables en électrophorèse bidimensionnelle. Ces modifications altèrent soit le point isoélectrique, soit la masse apparente de la protéine et aboutissent sur la carte bidimensionnelle à l'apparition de séries de spots. La comparaison de différents gels 2D (cadmium / contrôle par exemple) révélerait ainsi les modifications post-traductionnelles qui apparaissent lors d'un stress. Ces variations pourront ensuite être caractérisées par une analyse dédiée par spectrométrie de masse. Mais d'autres approches de protéomique différentielle sont également envisageables. De nombreuses

perspectives visant à étudier le rôle de la vacuole dans la détoxification métallique grâce à l'utilisation des données de protéomique acquises sont donc possibles (Chapitre III).

L'exploitation des données de spectrométrie nous a permis d'aboutir à une caractérisation approfondie du protéome soluble vacuolaire. Ces travaux font l'objet d'une publication qui doit être soumise très prochainement intitulée : An unexpected metabolic and signalling network linking the vacuole and the cytosol of *Arabidopsis thaliana* revealed by proteomics dissection. F. Villiers\*, **N. Jarno\***, M. Jaquinod, L. Kuhn, M. Nicaise, A. Jourdain, T. Rabilloud, C. Bruley, J.Garin and J. Bourguignon.

Toutefois la mise en évidence de fonctions vacuolaires particulières, reliées à la détoxification métallique ou non, nécessite une vision globale de l'ensemble des protéines de cet organite. Nous avons donc complété le travail effectué sur la fraction soluble par une analyse de la fraction membranaire de la vacuole.

# Chapitre II : Analyse protéique de la fraction membranaire vacuolaire d'*Arabidopsis* *thaliana*

## **I - Introduction**

Le protocole développé, afin de purifier des vacuoles d'*Arabidopsis thaliana*, nous permet d'obtenir des vacuoles intactes. Suite à une lyse des vacuoles et une centrifugation, la fraction soluble (présentée dans le premier chapitre) est séparée de la fraction membranaire et celles-ci sont analysées de façon indépendante. La Figure 40 présente la stratégie générale d'analyse mise en place pour étudier les constituants protéiques membranaires de la vacuole.

À partir de cellules d'*Arabidopsis thaliana* en culture, les vacuoles sont purifiées sur deux gradients successifs de Ficoll (Figure 40-A). Après deux cycles de congélation / décongélation, les vacuoles purifiées sont lysées (Figure 40-B), puis centrifugées afin de séparer la fraction strictement soluble (les sucs vacuolaires) et les protéines le plus faiblement associée à la membrane, de la fraction membranaire totale. La fraction membranaire est incubée en présence de 500 mM de NaCl et de nouveau centrifugée afin de « décrocher » les protéines fortement associées à la membrane. On obtient ainsi deux fractions membranaires, une qui contient les protéines purifiées faiblement associées ou de façon transitoire, dite fraction « associée » et l'autre qui contient les protéines purifiées fortement associées à la membrane dite strictement membranaire.

Afin d'aller plus loin dans la détermination de l'orientation des protéines vacuolaires membranaires, intra-vacuolaire ou du côté cytosolique, des expériences de « *Shave and Conquer* » ont été initiées. Celles-ci consistent à réaliser une digestion par la protéinase K de vacuoles intactes afin de dégrader les protéines de la face externe des organites (Figure 40-C).



Les vacuoles, ainsi « rasées », sont alors purifiées une nouvelle fois sur gradient de densité afin d'éliminer les peptides externes protéolysés. Les vacuoles sont fractionnées en échantillons soluble et membranaire totale, sans lavage salin des membranes. Les échantillons de membranes soumis à l'action de la protéinase K (rasés) sont alors comparés avec ceux non soumis à l'action de l'enzyme (contrôles) par des analyses protéomiques.

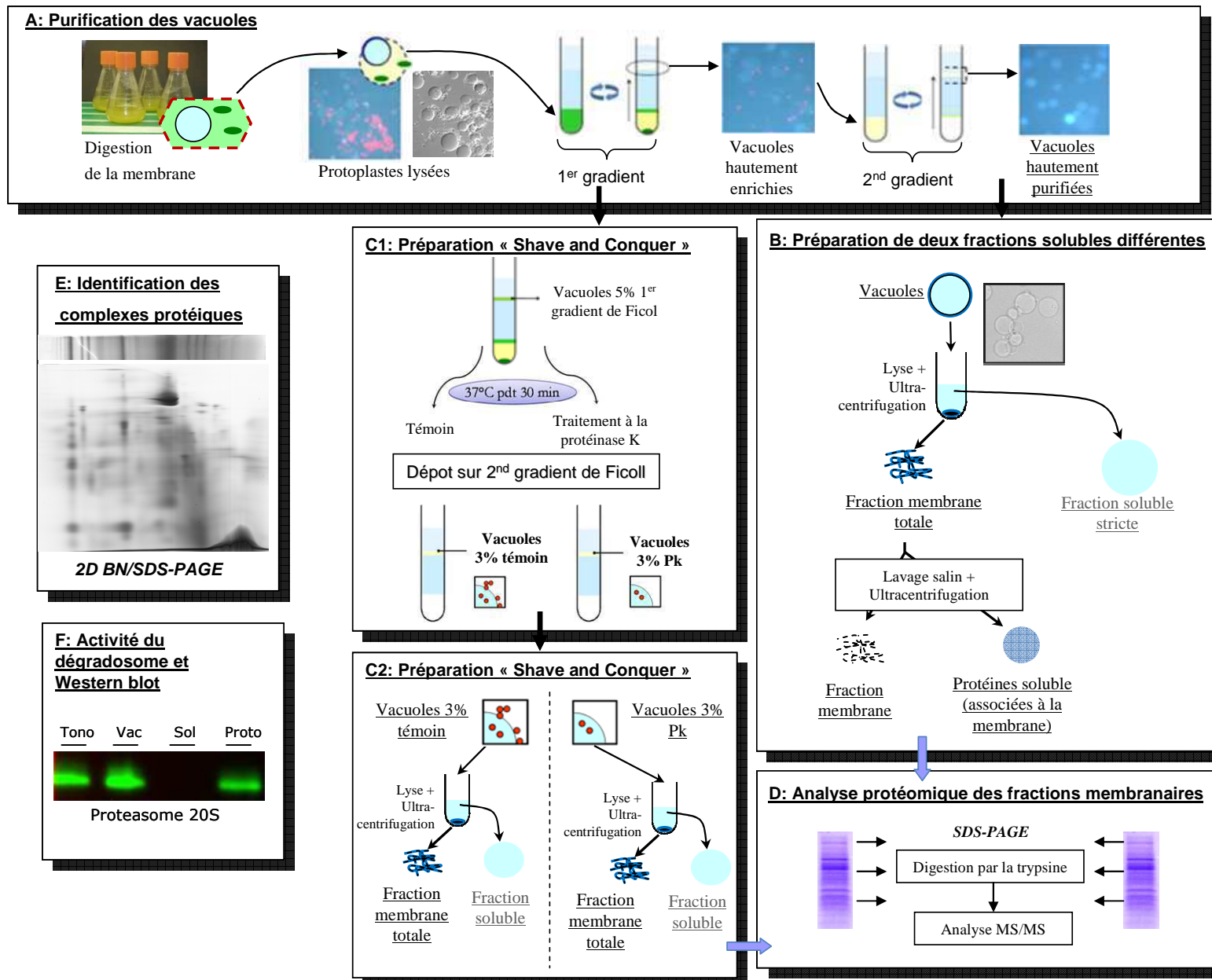
Les différents échantillons de la fraction membranaire sont alors analysés par spectrométrie de masse (Figure 40-D). Pour ce faire, nous avons réalisé de courtes électrophorèses de type SDS-PAGE (environ 2,5 cm de migration) à partir de 20 µg de protéines membranaires pour chacun des échantillons. Les pistes de migration ont été découpées en quinze fragments, analysés séparément par spectrométrie de masse, cela permet de diminuer la complexité des échantillons. Le contenu protéique de chaque morceau de gel a été soumis à l'action de la trypsine. Les identifications des protéines ont été réalisées sur la plateforme protéomique (EDyP) à l'aide d'une chaîne nanoLC-Orbitrap.

Cette étude a débouché sur l'identification de 1084 protéines (Protéothèque), ce qui représente la plus importante identification protéique réalisée sur des fractions tonoplastiques, à ce jour. Cette analyse complémentaire des travaux réalisés dans Jaquinod *et al.*, 2007 a permis d'identifier 507 protéines supplémentaires au niveau du tonoplaste.

L'analyse des fractions strictement membranaire et associée, ainsi que les expériences de « Shave and Conquer », nous ont permis de mettre en évidence des interactions entre certaines protéines cytosoliques et le tonoplaste particulièrement intéressantes.

Afin de compléter la caractérisation protéomique des vacuoles végétales, nous avons souhaité évaluer la présence des interactions protéiques ou complexes dans la fraction membranaire totale. Pour cela, nous avons réalisé de gels d'électrophorèse en condition native, les blue native PAGE. Nos analyses mettent en évidence un complexe particulier de plusieurs protéases associé au tonoplaste. Ce complexe impliqué dans les mécanismes de dégradation des protéines (dégradosome) a été suivi dans nos échantillons par des mesures d'activité enzymatique et des immunorévélations.



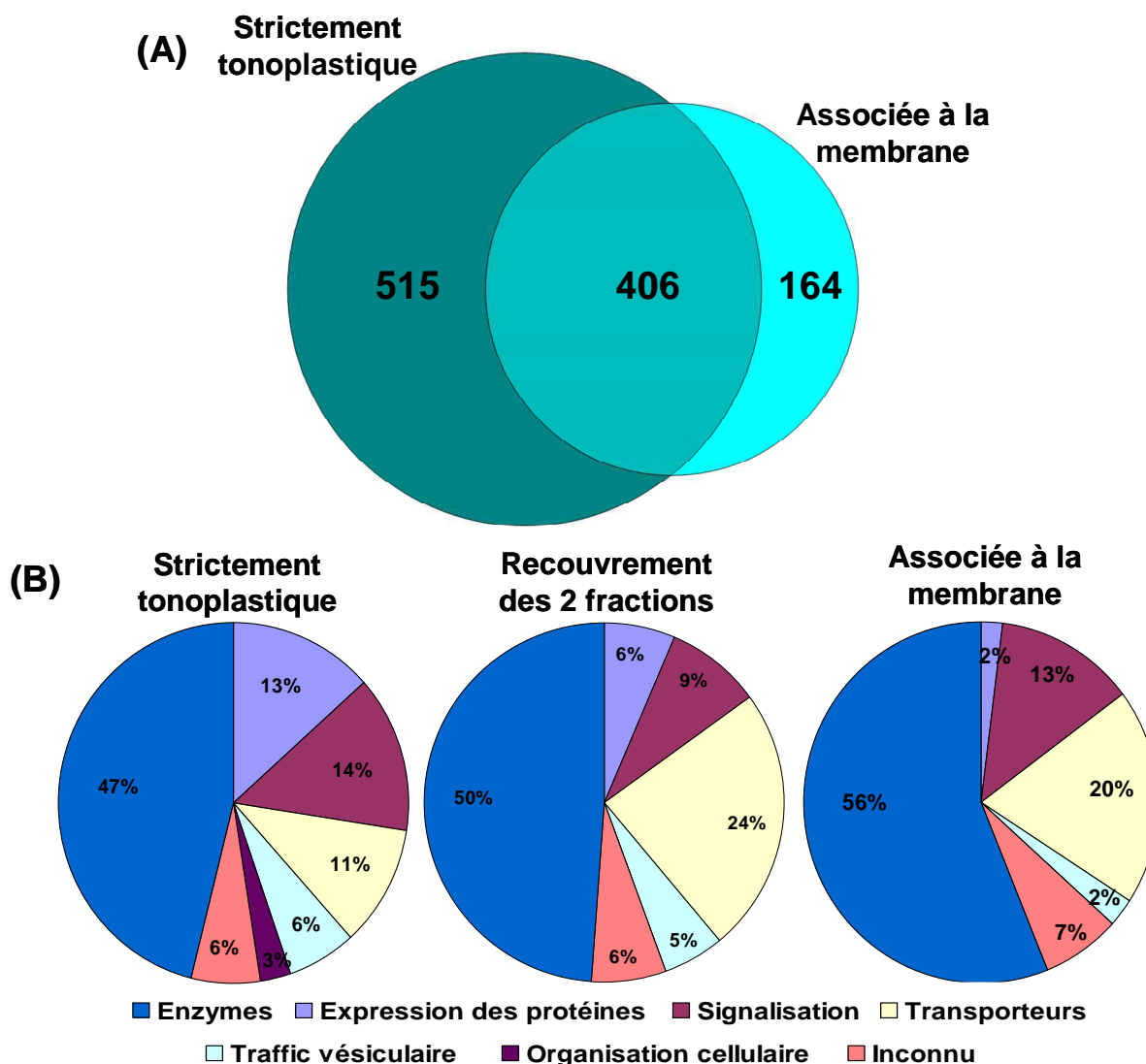


**Figure 40 : Analyse par spectrométrie de masse de la composition protéique de la membrane de vacuoles d'*Arabidopsis thaliana*.** (A) Les vacuoles sont purifiées à partir de cellules d'*Arabidopsis thaliana* en culture selon la méthode du double gradient. (B) Les vacuoles sont lysées par congélation / décongélation puis centrifugées permettant une séparation de la partie membranaire, de la fraction soluble (les sucs vacuolaires). La fraction membranaire est à nouveau centrifugée en présence de 500 mM de NaCl permettant une séparation des protéines associées à la membrane, des protéines intégrées à la fraction membranaire. (C) Une analyse complémentaire de « shave and conquer » a consisté en une comparaison des identifications obtenues sur les échantillons traités à la protéinase K (P<sub>K</sub>) et ceux qui ne le sont pas. (D) 20 µg de chacun des échantillons protéiques isolés de la fraction membranaire ont été séparés par électrophorèse (SDS-PAGE, 12% d'acrylamide, 2,5 cm de migration) puis divisés en 15 fractions analysées chacune par nanoLC-MS/MS. (E) Des blue-native PAGE ont été réalisés sur la fraction membranaire totale afin d'identifier les complexes protéiques tonoplastiques. (F) Un complexe de protéines impliquées dans les mécanismes de dégradation des protéines (dégradosome) a été étudié plus particulièrement par des mesures d'activité enzymatique et des immunorévélations.

## II - Analyse de la composition protéique du tonoplaste

### II.1 - Analyse globale

Les identifications réalisées sur la fraction membranaire des vacuoles ont conduit à l'établissement d'une liste de 1084 protéines non redondantes dont 921 identifiées dans la fraction membranaire stricte et 570 dans la fraction associée à la membrane (Figure 41-A).



**Figure 41 : Répartition des protéines identifiées dans les fractions strictement tonoplastique et associée à la membrane. (A)** Diagramme de Venn figurant la répartition des protéines entre les deux fractions. Sur les 1084 protéines identifiées 406 sont communes aux deux fractions, 515 identifications sont apportées par la fraction strictement tonoplastique et 164 par la fraction associée à la membrane. **(B)** Classification par catégories fonctionnelles des protéines identifiées dans les 3 ensembles de protéines délimitées sur le diagramme de Venn.

Parmi les 1084 protéines non redondantes identifiées, dans l'échantillon membranaire totale, 406 protéines sont communes aux deux fractions, 515 protéines sont exclusivement identifiées dans la fraction tonoplastique stricte et 164 sont uniquement identifiées dans la fraction associée à la membrane (Figure 41-A). Les protéines de chacune de ces sections ont été classées en 7 grandes catégories, sur la base des informations extraites dans les bases ARAMEMNON (Arabidopsis plant membrane proteins database), SUBA II (SubCellular Proteomic Database II) et de la classification proposée par le MapMan system (cf. Matériels et Méthodes). Les catégories définies sont les enzymes, les transporteurs, les protéines impliquées dans la signalisation ou la régulation de l'expression protéique, les protéines de classification inconnue, le trafic vésiculaire et l'organisation cellulaire (Figure 41-B).

De façon surprenante, alors qu'on pourrait s'attendre à ce que les transporteurs représentent la plus grande proportion de protéines identifiées, les enzymes sont majoritaires dans chacun des cas. Les enzymes représentent environ 50 % des différentes distributions fonctionnelles soit 238 enzymes identifiées dans la fraction strictement tonoplastique, 199 enzymes communes et 92 uniquement dans la fraction associée. Cela signifie que les activités hydrolytiques de la vacuole sont largement représentées dans la fraction membranaire totale. Elles sont caractérisées par l'identification de 33 glycosidases dont 26 strictement identiques à celles précédemment identifiées dans la fraction soluble et 7 homologues appartenant à des familles de glycosyl hydrolases similaires à celles précédemment observées (selon la classification CAZy). Soixante-douze protéases et deux inhibiteurs de protéases ont également été identifiés dont 30 protéases strictement identiques à celles du soluble et 7 protéases homologues dont la serine carboxypeptidase-like 8, soit la 11<sup>ème</sup> SCPL identifiée dans notre protéome vacuolaire.

Il est intéressant de noter que parmi les 36 protéases identifiées exclusivement dans la fraction membranaire 32 sous-unités du protéasome (appartenant aux domaines 20S – famille T1B et 19S - famille M67) ainsi que la thimet oligopeptidase (TOP) sont présentes. La TOP (At5g10540) clive de petits olipeptides de 5 à 15 acides aminées. Décrites pour être cytosoliques, leur co-purification avec les membranes vacuolaires, suggère leur association au tonoplaste, probablement pour des raisons physiologiques. Ce point sera approfondi par la suite.

Les deux dernières catégories citées, qui n'étaient pas représentées dans les analyses de la fraction soluble vacuolaire, représentent dans ces 3 ensembles entre deux et neuf pourcent des protéines. On retrouve, ainsi, une protéine de la famille des SNARE (*Soluble NSF Attachment protein Receptor*), connues pour réguler la fusion des vésicules (Uemura *et al.*, 2002). Mais aussi des protéines telles que CIP1 (*COPI-Interactive Protein*, score MASCOT de

1838), liée au cytosquelette et capable d'interagir avec COP1 (*coatmer adaptator protein*) (Matsui *et al.*, 1995), également identifiée. Ces protéines de manteau structurent les vésicules et permettent leur adressage. Comme décrit dans l'introduction, dans la partie biogenèse des vacuoles, le tonoplaste est une interface d'échange entre le milieu cellulaire (le cytoplasme) et l'intérieur de la vacuole. Ces échanges ont lieu avec le système sécrétoire, par la fusion de vésicules, d'où la présence de ces familles de protéines.

Cinquante neuf protéines n'ont pas été classées, soit parce que la protéine est identifiée mais son rôle exacte n'est pas connu (*Tobamovirus multiplication protein* par exemple), soit parce que la protéine n'est pas caractérisée (*expressed protein* principalement).

L'un des rôles majeurs de la vacuole est le stockage, temporaire ou permanent, de composés variés. Le caractère essentiel de cette fonction est, quand même, illustré par le nombre élevé de protéines de transport retrouvé dans la fraction tonoplastique (153), (Figure 41).

Cinquante-six protéines, impliquées dans la réponse cellulaire au stress, sont également représentées. Il s'agit notamment de thioredoxines, d'ascorbate peroxidase, impliquées dans la réponse aux stress oxydants, des *DNAJ heat shock protein* (famille des HSP) en réponse au stress thermique, ou encore des méthyltransférases impliquées dans la réponse au stress hydrique.

Plusieurs protéines, décrites pour être des intermédiaires de la transduction de signaux, (108) ont également été identifiées, et notamment dix membres de la famille des 14-3-3 (fraction strictement tonoplastique uniquement). Ces protéines sont les ligands directs d'une grande variété de substrat protéiques : récepteurs membranaires, kinases ou phosphatases par exemple, pour lesquelles elles ont des activités régulatrices (Roberts, 2003). La co-purification avec le tonoplaste des 14-3-3 identifiées, alors qu'on ne leur connaît pas de domaine de liaison à la membrane, suggère qu'elles sont impliquées dans des mécanismes de régulation de la transduction de signaux au niveau de la vacuole. De tels processus n'ayant jamais été décrits, ces résultats sont particulièrement intéressants dans la compréhension du fonctionnement de la cellule végétale et du rôle qu'y tient la vacuole. Sont également présentes de nombreuses petites protéines G (18), bien connues pour leur fonction dans la cascade de signalisation cellulaire. Mais aussi 10 protéines *Leucine rich-repeat* (LRR) qui sont décrites comme des récepteurs à activité kinase.

De prime abord, les diagrammes (Figure 41-B) ne font pas apparaître de différences marquées entre les différentes fractions, sauf pour la régulation de l'expression des protéines dont la proportion passe de 2 % dans la fraction associée à 13 % dans la fraction stricte. Ainsi,

dans la fraction tonoplastique stricte, 44 protéines ribosomales des familles L (60S) et S (40S) ont été identifiées. Neufs protéines chaperonnes HSPs ont également été identifiées. Dans la fraction associée à la membrane, seulement trois protéines ribosomales sont identifiées pour seules représentantes de cette catégorie.

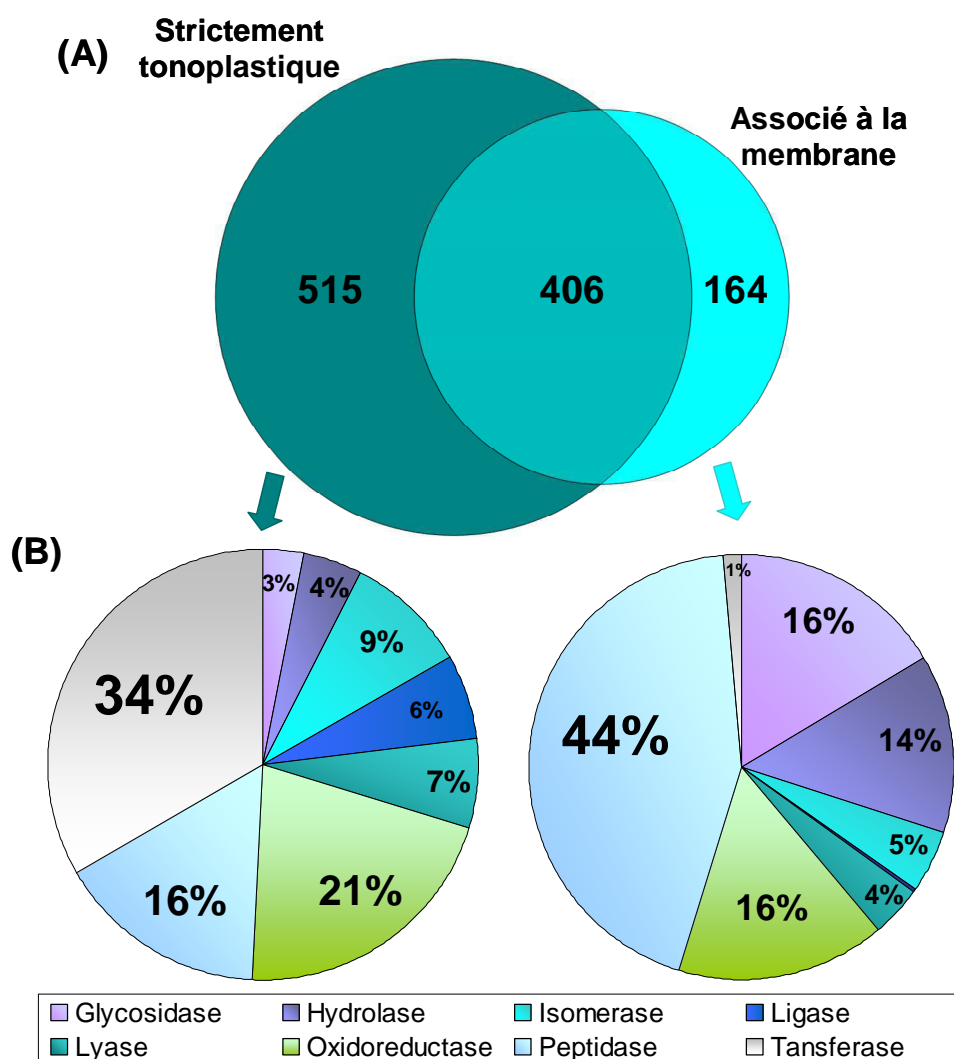
## **II.2 - Comparaison des fractions associées et strictement membranaires**

Au sein de la cellule, l'organisation des organites et des membranes permet une spécialisation des fonctions, alors quelle est la spécificité de nos deux fractions ?

### **II.2.1 - Les enzymes**

Le détail de la classification des enzymes, entre les deux fractions, révèle des différences de répartition des hydrolases. Les hydrolases sont impliquées dans les processus de dégradation et de recyclage des composés cellulaires, et se répartissent entre protéases, glycosidases, lipases et nucléases. Les glycosidases et les protéases étant très représentées dans nos échantillons, ces deux catégories sont extraites des hydrolases et apparaissent sur le diagramme (Figure 42). La somme des hydrolases (glycosidases et peptidases comprises) représentent 23 % des protéines identifiées dans la fraction strictement associées à la membrane, contre 74 % pour l'associée. La répartition inverse s'observe pour les transférases avec 34 % identifiée dans la fraction stricte, contre 1 % seulement dans l'associée. Les transférases sont des enzymes qui transfèrent un groupement chimique, par exemple, un groupement méthyle ou glycosyl, d'un composé donneur à un accepteur.

Il existerait donc une répartition, des fonctions enzymatiques, hétérogènes entre ces deux fractions.

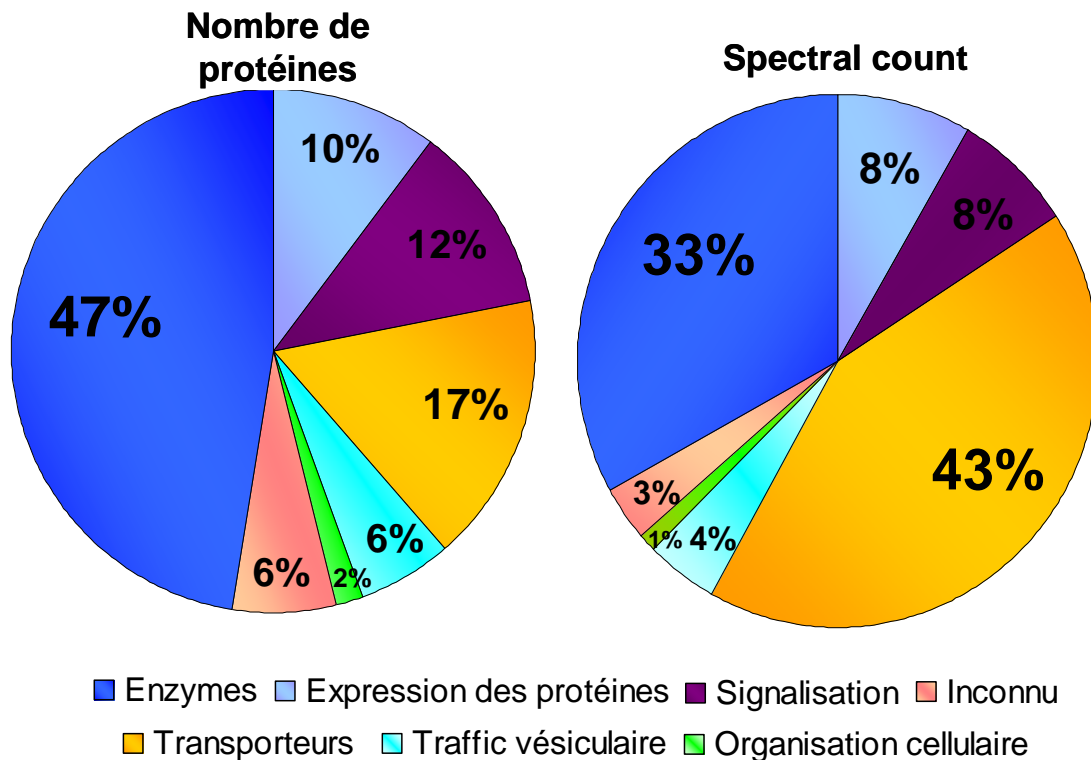


**Figure 42 : Répartition des classes d'enzymes dans les deux fractions tonoplastiques.** (A) Diagramme de Venn figurant la répartition des protéines entre les deux fractions. Sur les 1084 protéines identifiées, 921 identifications sont issues de la fraction strictement tonoplastique et 570 de la fraction associée à la membrane. (B) La classification des enzymes est basée sur les recommandations prescrites par le NC-IUBMB (cf. Annexe 2). Les deux diagrammes représentent la répartition des enzymes dans nos deux échantillons.

## II.2.2 - Les transporteurs

Cent quatre-vingt cinq transporteurs ont été identifiés dans la fraction membranaire totale dont 97 en commun aux deux fractions, 56 uniquement dans la fraction strictement membranaire et 32 dans l'associée. Les scores *MASCOT* élevés obtenus, notamment dans la fraction stricte, suggèrent que si les membres de cette catégorie sont variés, ils sont aussi fortement représentés. Si l'on observe, cette fois, les représentations de classement par catégorie fonctionnelle, non en fonction du nombre de protéines identifiées mais en fonction du 'spectral count' (SpC) la répartition des 570 protéines de la fraction associée ne varie pas (non

montré). Par contre, un changement notable est observable pour les 921 protéines identifiées dans la fraction plus fortement associée à la membrane (Figure 43).



**Figure 43 : Classification fonctionnelle des protéines identifiées dans la fraction strictement tonoplastique en fonctions du nombre de protéines identifiées ou du spectral count.**

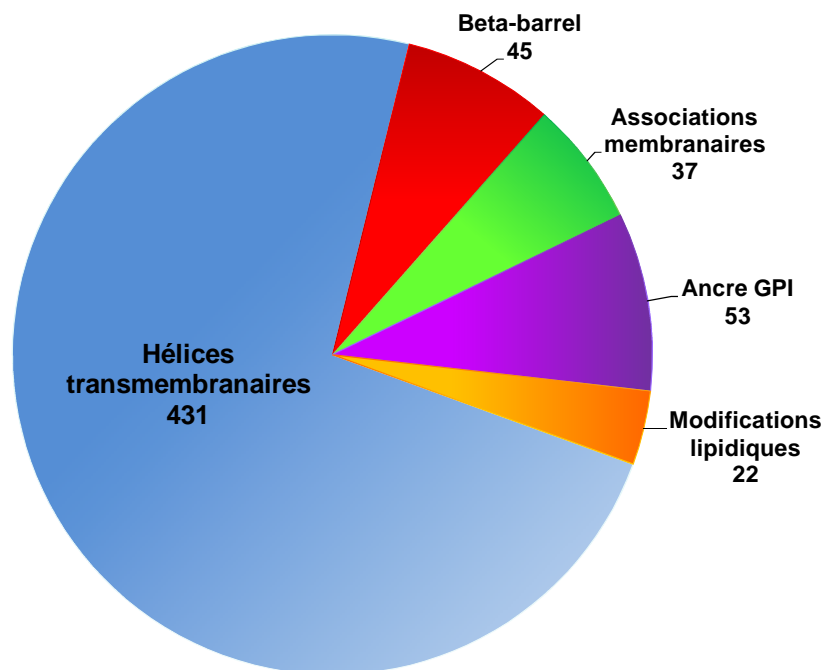
Si le nombre de transporteurs identifiés, dans la fraction strictement tonoplastique, ne représente que 17 % du total des protéines identifiées, les valeurs de 'spectral count' mettent en évidence que leur abondance relative est en réalité de 43 %. Les transporteurs ont donc la proportion la plus élevée, avant les enzymes (33 %), dans la gamme dynamique de concentration des protéines de notre échantillon tonoplastique. Les transporteurs de type *Multidrug resistance-associated protein* MRP appartenant à la famille des ABC contiennent entre 9 et 16 domaines transmembranaires. Dans nos conditions, le pourcentage de séquence observable est alors de 40 %. Du fait de l'inaccessibilité des peptides transmembranaire dans nos conditions, l'estimation de la représentativité des transporteurs est certainement sous évaluée.



### **II.3 - Analyse des spécificités de la membrane**

Parmi les 1084 protéines identifiées, dans la fraction membranaire totale, 587 protéines sont liées à la membrane par des liaisons de nature amphiphatique. Deux grands types d'association membranaire sont possibles, on distingue les protéines qui traversent la membrane ou protéines intrinsèquement membranaires (polytopique) et les protéines en contact avec la membrane (monotopique). Quatre cent soixante seize protéines identifiées peuvent être considérées comme intrinsèquement membranaires. Elles comportent un ou plusieurs domaines transmembranaires (jusqu'à 16 hélices alpha) ou sont constituées d'un tonneau beta (2 à 22 feuillets  $\beta$ ). Les cent-onze protéines monotopiques comptent 75 protéines présentant une lipidation, c'est-à-dire un site prédit ou connu de liaison covalent à des lipides : myristoylation (2 protéines), prénylation (3 protéines), palmitoylation (5 protéines), géranylgéranoylation (11 protéines) ou ancre glycosylphosphatidylinositol (ancres GPI : 53 protéines). D'autres contiennent des sites de liaisons à des protéines intrinsèquement membranaires (37 protéines), c'est le cas des sous-unités V1 de l'ATPase vacuolaire. La Figure 44 présente la nature des liaisons à la membrane de 587 protéines identifiées et connues ou prédites pour être associées au tonoplaste. Cette forte représentation de protéines hydrophobes, contenant jusqu'à 16 segments transmembranaires, souligne l'efficacité du protocole d'identification utilisé. Sûrement beaucoup d'autres protéines interagissent avec le tonoplaste, soit par la présence de boucles contenant des résidus hydrophobes, soit par des liaisons hydrostatiques directes avec les phospholipides membranaires ou indirectes grâce à des interactions ioniques (ions calcium par exemple).



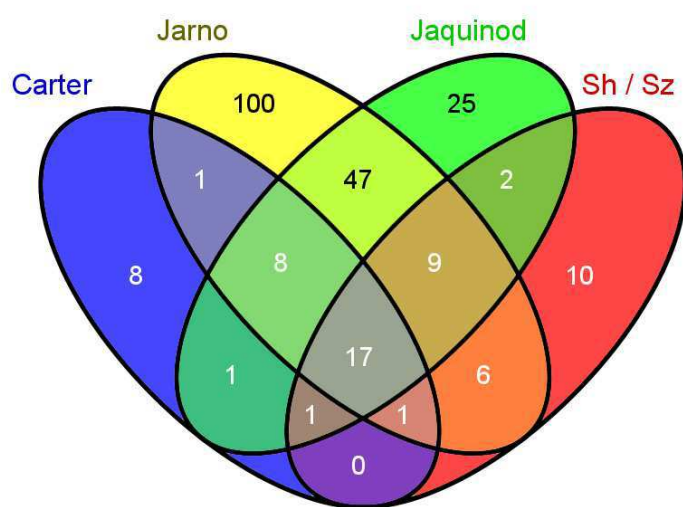


**Figure 44 : Association protéines / membrane selon la nature des liaisons amphiphatiques.** Classification des 587 protéines identifiées dans la fraction membranaire totale et prédites ou connues pour être associées au tonoplaste. On distingue les protéines intrinsèquement membranaires (contenant une à seize hélice(s) alpha transmembranaire(s) ou tonneau beta de 2 à 22 feuillets  $\beta$  : 476), les protéines solubles associées à des protéines membranaires (37) et les protéines liées à la membrane par un lipide (ancres GPI : GlycosylPhosphatidylinositol et les acylations 75)

### II.3.1 - Les transporteurs

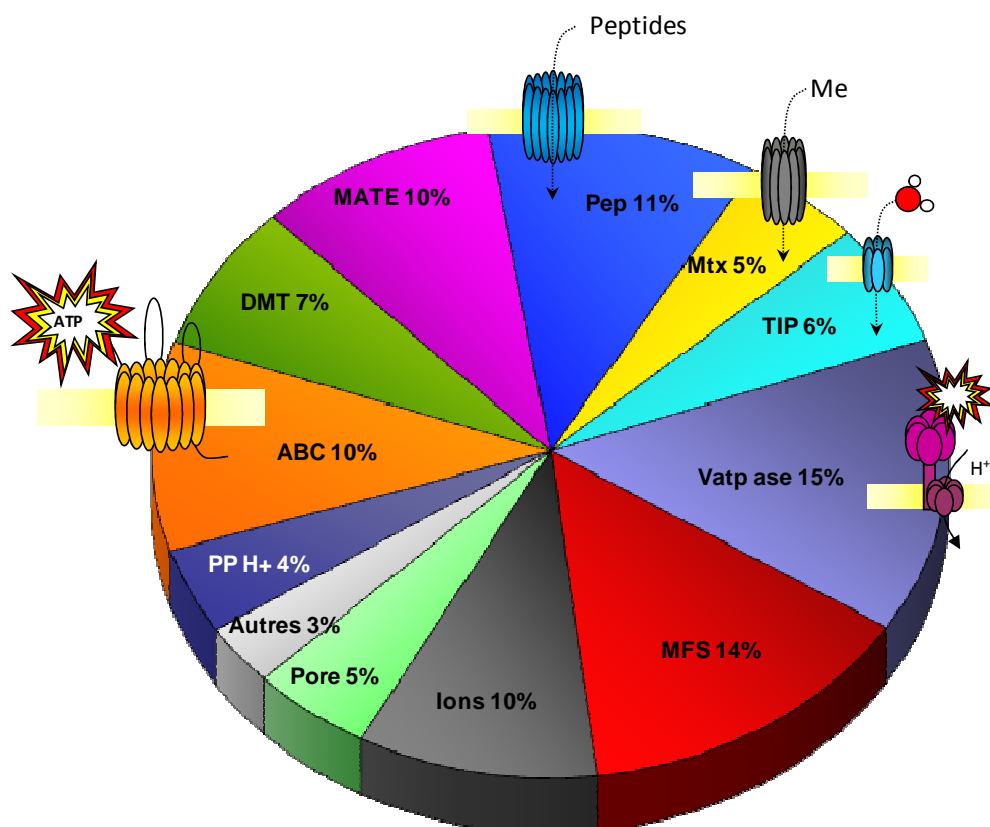
Les transporteurs possèdent de nombreux domaines transmembranaires, afin de permettre leur ancrage à travers la membrane. Cette particularité, la présence de larges segments hydrophobes, rend ces protéines particulièrement difficiles à extraire des membranes en vue de leur analyse. Une première caractérisation menée par l'équipe a permis d'identifier 110 transporteurs (Jaquinod *et al.*, 2007). La nouvelle stratégie d'analyse protéomique que nous avons mis en place a permis d'identifier 189 protéines associées aux transports de composés. Par comparaison, les publications de Szponarski *et al.* (2004), Shimaoka *et al.* (2004) et Carter *et al.* (2004) font état, respectivement, de 13, 41 et 37 transporteurs qui représentent un total de 64 protéines non redondantes. Notre contribution à l'étude du protéome tonoplastique a permis d'ajouter 172 protéines à la liste établie, portant à 236 le nombre de protéines de transports non

redondants identifiés par l'ensemble des travaux soit 100 supplémentaires à l'étude de Jaquinod *et al.* (2007).



**Figure 45 : Contributions de différents travaux de protéomique vacuolaire à l'établissement d'une liste de transporteurs tonoplastiques :** Carter pour Carter *et al.* (2004) ; Sz pour Szponarski *et al.* (2004) et Sh pour Shimaoka *et al.* (2004) ; Jaquinod pour Jaquinod *et al.*, 2007a et enfin Jarno pour nos travaux.

La Figure 46 présente les contributions relatives des 4 publications considérées (Carter *et al.*, 2004; Shimaoka *et al.*, 2004; Szponarski *et al.*, 2004; Jaquinod *et al.*, 2007a) et de nos travaux dans l'identification des transporteurs tonoplastiques. Il est intéressant de noter que, sur l'ensemble des transporteurs, la stratégie d'analyse protéomique, pour laquelle nous avons opté, nous permet d'identifier la grande majorité d'entre eux (près de 90 %). Cette particularité est intéressante, si l'on considère que les perspectives de ce travail sont d'identifier, mais également de suivre la dynamique de transporteurs, éventuellement impliqués, dans la détoxification du cadmium. Si l'on soustrait les transporteurs assignés au chloroplaste et la mitochondrie, il reste alors 83 nouveaux transporteurs vacuolaires potentiels. Les transporteurs que nous avons identifiés ont été répartis en 11 classes majeures (Figure 46) : sous-unités de l'ATPase vacuolaire, et de la pyrophosphatase (PPase H<sup>+</sup>), aquaporines (TIP), canaux ioniques, transporteurs de métaux, transporteurs d'acides aminés et de peptides, protéines à domaine SPFH (MATE efflux), transporteurs à *ATP Binding Cassette* (ABC), transporteurs de drogues et de métabolites (DMT), transporteurs de la *Major Facilitator Superfamily* (MFS) dont des transporteurs de sucres et enfin les pores. Les 83 transporteurs nouvellement identifiés dans nos échantillons comprennent de nombreux MATE efflux, des ABC et canaux ioniques.



**Figure 46 :** Principales classes de transporteurs identifiées dans le tonoplaste de la vacuole, classées selon l'ontologie de la *Transporters classification data base* (TCDB).

#### II.3.1.1 - Les pompes à protons

Deux types de pompes sont responsables de l'influx de protons à l'intérieur de la vacuole et ont pu être identifiés dans nos analyses : la pyrophosphatase ( $H^+$ -PPase), dont une isoforme a été identifiée (AVP1) et le complexe de l'ATPase vacuolaire ou ATPase de type V ( $V_{ATPase}$ ). La quasi-totalité des sous-unités de la  $V_{ATPase}$  a été identifiée. Ce complexe protéique est composé de 13 sous-unités chargé de l'import actif de protons dans la vacuole *via* l'hydrolyse d'ATP (cf. synthèse bibliographique). Il est formé de deux domaines, l'un soluble, catalysant l'hydrolyse de l'ATP (domaine V1), et l'autre, transmembranaire, permettant le passage des protons à travers le tonoplaste (domaine V0). Ce complexe est un constituant majeur de la vacuole, et l'identification de 12 des 13 sous-unités le composant avec pour certaines de très hautes valeurs MASCOT (jusqu'à 4897) mais surtout une somme des '*spectral count*' de 6139 traduit sa forte représentativité et son abondance. Les 12 sous-unités identifiées ont été retrouvées dans la fraction membranaire et soluble (Tableau I). Certaines sous-unités, codées par plusieurs gènes, ont pu être identifiées sous leurs différentes isoformes. Ainsi les huit sous-unités du domaine V1 ont toutes été identifiées. Parmi celles-ci, 5 sont codées par un seul gène, alors que les 3 autres ont chacune 3 isoformes. Les différentes sous-unités du

domaine V1 sont donc codées par 14 loci, dont 10 ont été retrouvées lors de nos analyses de nos échantillons. Nous avons pu identifier au moins deux isoformes des quatre sur cinq sous-unités du domaine membranaire V0 (Tableau I).

**Tableau I : Sous unités-de l'ATPase vacuolaire.** Les scores MASCOT des sous-unités identifiées dans nos travaux pour les analyses de la fraction membranaire et soluble sont précisés. Lorsque des sous-unités ont été précédemment observées dans les travaux Jaquinod *et al.*, 2007 l'annotation Jaq est indiquée.

Sous-unité	Score MASCOT			Sous-unité	ATG	Score MASCOT	
	Tonoplaste	Soluble	Tonoplaste			Soluble	
V1 - Domaine catalytique				V0 - Canal à protons			
VHA A - Sous unité calalytique de liaison l'ATP				VHA-a - Couplage, assemblage			
VHA-A	At1g78900	4887	2893	VHA-a1	At2g28520	-	-
VHA B- Sous unité non calalytique de liaison l'ATP				VHA-a2	At2g21410	2349	1674
VHA-B1	At1g76030	3813	2098	VHA-a3	At4g39080	3681	2002
VHA-B2	At4g38510	3210	1819	VHA-c - Translocation des protons			
VHA-B3	At1g20260	Jaq	-	VHA-c1	At4g34720	-	-
VHA C - Stabilité du domaine V1				VHA-c2	At1g19910	-	Jaq
VHA-C	At1g12840	1414	465	VHA-c3	At4g38920	-	455
VHA-D - Axe central, couplage				VHA-c4	At1g75630	-	-
VHA-D	At3g58730	551	414	VHA-c5	At2g16510	764	-
VHA E - Axe central ou périphérique				VHA-c'' - Translocation des protons			
VHA-E1	At4g11150	2297	550	VHA-c''1	At4g32530	144	-
VHA-E2	At3g08560	Jaq	-	VHA-c''2	At2g25610	-	-
VHA-E3	At1g64200	1726	-	VHA d - Assemblage et stabilité du domaine V0			
VHA-F - Liaison entre les domaines V1 et V0				VHA-d1	At3g28710	2536	1892
VHA-F	At4g02620	335	-	VHA-d2	At3g58715	2528	1948
VHA-G - Couplage entre les domaines V1 et V0				VHA-e			
VHA-G1	At3g01390	291	Jaq	VHA-e1	At5g55290	-	-
VHA-G2	At4g23710	Jaq	-	VHA-e2	At4g26710	-	-
VHA-G3	At4g25950	-	-				
VHA H - Sous unité régulatrice							
VHA-H	At3g42050	1356	168				

Les sous-unités composant le domaine V1 de l'ATPase vacuolaire sont beaucoup mieux identifiées que celles du domaine V0. Ces résultats s'expliquent de par la nature différente de ces deux domaines, l'un étant soluble et l'autre membranaire et donc composé de protéines très hydrophobes difficiles à extraire des membranes. Cependant les scores *MASCOT* élevés des sous-unités VHA-a2 et VHA-a3 (respectivement 2349 et 3681) sont à pondérer de par leur

localisation émergée dans le complexe à la surface du tonoplaste afin de permettre l'assemblage des deux domaines.

Les travaux de Shimaoka *et al.* (2004), de Carter *et al.* (2004) et de Schmidt *et al.* (2007) ont abouti à une couverture équivalente dans l'identification des sous-unités de l'ATPase vacuolaire. Le fait que les sous-unités VHA-e n'aient pas été retrouvées non plus dans leurs études pourrait s'expliquer de par leur petite taille (8 kDa) et la faible représentation de ces protéines au sein du complexe de la V-ATPase.

### II.3.1.2 - Transporteurs à « ATP Binding Cassette » (ABC)

Nos travaux ont permis d'identifier 17 transporteurs ABC représentant 5 sous-familles (Tableau II) : Pleiotropic Drug Resistance (PDR), Non-Intrinsic ABC Protein (NAP), Transporter associated with Antigen Processing (TAP), Multidrug Resistance-associated Protein (MRP). Les transporteurs ABC pour *ATP Binding Cassette* permettent un import actif de composés divers grâce à l'hydrolyse d'ATP. Le génome d'*Arabidopsis thaliana* compte 129 transporteurs de ce type, divisés en 12 sous-familles (Sanchez-Fernandez *et al.*, 2001). Parmi celles-ci sont présents des transporteurs de sucres, de lipides, de conjugués du glutathion, d'alcaloïdes, de stéroïdes ou encore d'acides organiques (Theodoulou, 2000 ; Martinoia *et al.*, 2002 ; Verrier *et al.*, 2008).

Sur les 17 transporteurs ABC identifiés dans nos échantillons (Tableau II), trois présentent une localisation tonoplastique avérée par des expériences de fluorescence *in vivo* : MRP1 (Klein *et al.*, 2004), MRP2 (Lee *et al.*, 2004) et TAP2 (Larsen *et al.*, 2007). Au totale, 14 protéines identifiées sont confirmées par les travaux de protéomique de différentes équipes (Tableau II). Nous confirmons également l'identification de NAP3 – At1g67940 issue de nos précédents travaux (Jaquinod *et al.*, 2007). NAP3 autrement nommé STAR1 serait impliqué dans le transport de l'aluminium *in planta* (Huang *et al.*, 2010). Trois transporteurs qui n'avaient pas de localisation connue ont pu être identifiés pour la première fois à la vacuole par protéomique (ABC A10 - At5g61740 ; ABC A2 - At2g41700 et ACD11 - At2g34690). ABC A2 et A10 n'ont pas de fonctions connues. Le transporteur ABC de type GLTP (Glycolipid transfer protein), ACD11 un transporteur des sphingosines serait impliqué dans l'activation du programme de mort cellulaire (PCD) et de la réponse hypersensible (HR) (Brodersen *et al.*, 2002 ; Malinovsky *et al.*, 2010 ; Palma *et al.*, 2010). Les enzymes identifiées dans nos travaux dans de tels phénomènes physiologiques ont déjà été citées plus haut, ACD11 pourrait être un médiateur du signal de PDC ou HR.

Parmi les transporteurs ABC que nous identifions dix appartiennent à la famille des Multidrug Resistance-associated Protein (MRP). Huit d'entre eux sont identifiés dans au moins deux autres études protéomiques, la localisation vacuolaire de MRP1 à 5, MRP 10, MRP11 et MRP14 pourrait être confirmée. MRP6 et MRP9 identifiées par Dunkley *et al.* (2006) selon la

méthode LOPIT comme plasmalemmique pourraient avoir une double attribution. Cette localisation à la fois vacuolaire et plasmalemmique est d'ailleurs observée pour MRP4. Localisée à la membrane plasmique par des expériences de fusion à la GFP (Klein *et al.* 2004) cette protéine semble faire partie des composants principaux du tonoplaste si l'on s'en réfère aux nombreux travaux qui l'identifient et aux excellents scores obtenus. Dans une moindre mesure, c'est également le cas de PDR8 localisée au niveau de la membrane plasmique par des expériences de localisation *in vivo* (Kobae *et al.*, 2006 ; Kim *et al.*, 2007) et confirmée dans les travaux de protéomique de Dunkley *et al.* (2006).

**Tableau II : Transporteurs ABC identifiés dans la fraction membranaire de la vacuole.** Les valeurs de score MASCOT, et le nombre de peptides identifiés (entre parenthèses) sont reportés ainsi que le spectral count spécifique (uniquement des peptides protéotypiques). Les références des autres travaux sont également spécifiées pour Szponarsky *et al.* (2004) (**Sz**) Shimaoka *et al.* (2004) (**Sh**), Carter *et al.* (2004) (**Ca**), Dunkley *et al.* (2006) (**Du**) et Jaquinod *et al.* (2007) (**Jaq**). (\* : protéines identifiées dans la fraction soluble également).

Nom	Locus	Tonoplaste		Refs
		Score (# pep.)	SpC spécifique	
ATP-Binding casette A et B				
AtABC A10	At5g61740	51 (1)	5	-
ABC A2	At2g41700	92 (2)	5	-
AtABC B25 (mt)	At5g58270	91 (2)	2	Du
Multidrug Resistance-associated Proteins (MRP), 10 / 15 membres				
AtMRP1 *	At1g30400	2040 (26)	181	Sz, Sh, Ca, Du, Jaq
AtMRP2	At2g34660	1542 (21)	54	Sh, Du, Jaq
AtMRP3	At3g13080	980 (19)	12	Du, Jaq
AtMRP4 *	At2g47800	2090 (32)	95	Sz, Sh, Ca, Du, Jaq
AtMRP5	At1g04120	690(13)	63	Du, Jaq
AtMRP6	At3g21250	642(11)	79	Du
AtMRP9	At3g60160	116 (2)	2	Du
AtMRP10 *	At3g62700	3291 (51)	349	Sh, Ca, Du, Jaq
AtMRP11	At2g07680	62 (1)	10	Sh, Ca, Du
AtMRP14	At3g59140	59 (1)	3	Du, Jaq
Pleiotropic Drug Resistance protein (PDR), 1 / 13 membres				
AtPDR8	At1g59870	465 (8)	36	Du, Jaq
Non-intrinsic ABC Protein (NAP), 1 / 15 membres				
AtNAP3	At1g67940	322 (5)	36	Jaq
Glycolipid transfer protein (GLTP), 1 / 5 membres				
AtACD11	At2g34690	113 (2)	4	-
Transporter associated with Antigen Processing (TAP), 1 / 3 membres				
AtTAP2	At5g39040	923 (14)	117	Sh, Ca, Du, Jaq

Enfin le transporteur TAP2 est identifié avec un spectral count spécifique<sup>1</sup> élevé de 117 (le score MASCOT est de 923). Ce transporteur est identifié par plusieurs travaux de protéomique vacuolaire (Shimaoka *et al.*, 2004; Carter *et al.*, 2004; Dunkley *et al.*, 2006;

<sup>1</sup> Spectral count spécifique = numération du nombre de spectres pour les peptides spécifiques de par leur séquence permettant d'identifier la protéine.

Jaquinod *et al.*, 2007). Il est aussi localisé à la vacuole par fusion à la GFP (Larsen *et al.*, 2007). Ces derniers auteurs démontrent également un phénotype d'hypersensibilité à l'aluminium chez le mutant *tap2*. Or les transporteurs ABC de type TAP ont été caractérisés chez l'homme où ils sont responsables du transfert de peptides antigéniques vers l'intérieur du RE. Ils permettent ainsi la présentation de ces peptides à l'extérieur de la cellule *via* le complexe majeur d'histocompatibilité de type I (CMHI). Leur implication dans les processus de présentation d'antigènes pourrait impliquer que les TAP soient en interaction avec le protéasome. Chez les plantes, TAP2 pourrait avoir une fonction dans la translocation de polypeptides, notamment de complexes peptidiques chélatant l'aluminium.

### II.3.1.3 - Aquaporines (*Tonoplast Intrinsic Proteins*)

Cinq isoformes de *Tonoplast Intrinsic Proteins* (TIP) ont été identifiées dans nos travaux (Tableau III). Elles sont représentatives des sous-familles 1 et 2. Les TIPs sont des aquaporines exclusivement vacuolaire dont les différentes sous-familles présentent une spécificité de répartition tissulaire. Au total parmi les 5 sous-familles, le génome d'*Arabidopsis thaliana* contient 10 gènes de TIP (Johanson *et al.*, 2001). D'après les données du site genevestigator ([www.genevestigator.com](http://www.genevestigator.com)), les ARN codant les TIPs de la sous-famille 3 (TIP3.1 et TIP3.2) ne sont exprimées que dans les graines, celle de la sous-famille 4, TIP4.1, est exclusivement exprimée au niveau racinaire. L'unique isoforme de la sous-famille 5 (TIP5.1) est spécifiquement exprimée par le pollen, c'est également le cas de la seule isoforme de la sous-famille 1 (TIP1.3) que nous n'identifions pas dans nos analyses (Tableau III).

Nom	Locus	Tonoplaste		Refs
		Score (# pep.)	SpC spécifique	
TIP1 (= γTIP - 3 membres)				
TIP1.1	At2g36830	159 (3)	8	Jaq
TIP1.2	At3g26520	151 (2)	4	Ca, Jaq
TIP2 (= δTIP - 3 membres)				
TIP2.1	At3g16240	918 (9)	471	Ca, Jaq
TIP2.2	At4g17340	264 (3)	24	Ca, Jaq
TIP2.3	At5g47450	192 (2)	2	

**Tableau III : Tonoplast Intrinsic Proteins (TIP) identifiées par nos travaux.** Les valeurs de score MASCOT, et le nombre de peptides identifiés (entre parenthèses) sont reportés ainsi que le spectral count spécifique (uniquement des peptides protéotypiques). Parmi les références seules Carter *et al.* (2004) (Ca) et Jaquinod *et al.* (2007) (Jaq) ont précédemment observés les aquaporines.



La répartition tissu-spécifique des protéines TIP permet de mieux appréhender l'identification uniquement des TIPs 1.1, 1.2 et des 3 membres des TIPs2 de notre modèle cellulaire. Or comme mentionné dans l'introduction, durant la transformation d'un type de vacuole à l'autre LV-PSV (lytique / stockage) les  $\gamma$ -TIPs sont substituées aux  $\alpha$ -TIPs (Jauh *et al.*, 1999 ; Muntz, 2007). Cependant ces résultats sont issus de travaux sur des cellules racinaires (Olbrich *et al.*, 2007 ; Hunter *et al.*, 2007), ils sont donc difficilement comparable aux résultats de protéomique réalisés sur d'autres types cellulaires.

Un autre point remarquable dans nos identifications des TIPs est la présence la TIP 2.3 qui est pour la première fois identifiée par des travaux de protéomique. L'expression de cette isoforme est décrite pour avoir une expression racinaire et dans les graines. Or il est fort probable que le niveau d'expression de la TIP 2.3 soit plus faible. Sa détection peut peut-être s'expliquer par l'utilisation d'un instrument de haute performance, l'orbitrap.

L'utilisation d'un orbitrap, nous a permis d'atteindre des protéines de plus faible abondance dans la gamme dynamique de concentration de l'échantillon (exemple de TIP 2.3) mais a conduit également à l'identification d'autre MIP (membrane intrinsic proteins) décrites pour être plasmalemmique (PIP). Les scores et les spectral count des PIP sont globalement plus bas que ceux des TIP. Nous n'identifions que des PIP 2A dont la PIP 2.5 At3g54820 qui n'a été identifiée dans aucune analyse protéomique de la membrane plasmique (données SUBA). Ces PIP pourraient avoir une localisation secondaire au niveau du tonoplaste ou correspondre à des contaminations par des fragments de plasmalemmes.

#### II.3.1.4 - Autres transporteurs

Cent trente trois autres transporteurs ont été identifiés dans nos analyses du protéome vacuolaire (Tableau annexe). Ils peuvent être répartis en plusieurs grandes classes :

##### a) *Transporteurs de métabolites de grandes tailles*

Quarante-deux sont impliqués dans le transport de métabolites de grande taille, tels que des lipides, des sucres, ou des toxiques divers. D'après la classification TCDB, seize transporteurs identifiés appartiennent à la famille de la *Major Facilitator Superfamily* (MFS). Les membres de la MFS sont des transporteurs secondaires capables de transporter des solutés à l'aide de gradients d'ions chimiosmotique (symport, antiport ou uniport). Ils sont largement caractérisés chez les bactéries en tant que perméases où ils permettent d'assurer la translocation de sucres simples, d'oligosaccharides, de drogues, d'acides aminés, de métabolites du cycle de Krebs, et une grande variété d'ions organiques et inorganiques (Pao *et al.*, 1998).



Nous identifions 16 membres de la famille des *Multidrug / Oligosaccharidyl-lipid / Polysaccharide* (MOP). La famille des MOP comporte 4 sous-familles dont les MATE (*Multidrug And Toxin Extrusion*) particulièrement intéressantes puisque les 16 représentants identifiés des MOP sont plus spécifiquement des MATE. Les MATE ont été caractérisés chez *Arabidopsis* par homologie avec les pompes d'efflux bactériennes de type PST (*Prokaryotic Polysaccharide Transporter* – sous-famille MOP) (Hvorup *et al.*, 2003). Le génome d'*Arabidopsis* contient 54 gènes codant pour des MATE, très représentée chez les plantes vertes, cette famille est malgré tout peu connue. Quelques membres sont caractérisés pour leur implication dans les mécanismes de détoxification des drogues. Leur fonction au niveau du tonoplaste est très probablement à rattacher au rôle de la vacuole dans la séquestration de toxiques.

Onze transporteurs de la famille des *Drug / Metabolite Transporter* (DMT) ont été identifiés, aussi appelés *Multidrug resistance* (MDR) (Jack *et al.*, 2001). Ces protéines sont impliquées dans les systèmes d'efflux des toxiques. Ils sont responsables de résistance, cliniquement significative, à des molécules chimiothérapeutiques comme la résistance à la chloroquine dans le traitement du paludisme (Rowena *et al.*, 2004).

Six «*platellin*» ont également été identifiées, ces transporteurs appartiennent à la famille des *General Secretory Pathway* (SEC) et seraient impliqués dans les mécanismes de trafic vésiculaire (Peterman *et al.*, 2006). Trois membres de la famille *Proposed Fatty Acid Group Translocation* (FAT) ont été identifiés dont un prédit peroxysomal. Ils sont décrits pour permettre le transport d'acides gras mais aussi de jasmonate (Shockey *et al.*, 2006). Enfin pour finir avec le transport des lipides, 2 transporteurs d'aminophospholipide, ALA10 et ALA2 ont également été identifiés (Gomes *et al.*, 2000).

Deux membres de la famille des *Glycoside-Pentoside-Hexuronide* (GPH) ont été identifiés (SUC 1 et SUC 4) impliqués dans le transport de saccharose (Sauer and Stolz 1994). SUC 1 serait essentiel pour créer une force motrice osmotique (impliquant des échanges hydriques) pour l'ouverture des anthères par déhiscence libérant ainsi les grains de pollen (hypotonie) ou pour la croissance du tube pollinique (hypertonie) (Stadler *et al.*, 1999).

#### b) Transporteurs de peptides et d'acides aminés

Le transport des peptides est représenté par les transporteurs ABC évoqués précédemment et par trois transporteurs de la famille des *Proton-dependent Oligopeptide Transporters* (POT) : At2g02040 (PTR2B), At1g22570 (unknown POT), et un OPT (*OligoPeptide Transporters*) At3g27020 (YSL6). La famille des OPT, absente chez les mammifères, est impliquée chez les plantes dans le transport de peptides de 3 à 6 aminoacides (Stacey *et al.*, 2002). YSL6

appartient à la sous-famille des Yellow Strip. YSL1 sont premier membre caractérisé chez le maïs est impliqué dans l'assimilation du fer par un symport  $H^+$  / phytosidérophore (Curie *et al.*, 2001). Les Yellow Strip *via* le transport des phytosidérophores et des nicotianamines sont capables de prendre en charge d'autres métaux (Schaaf *et al.*, 2004). PTR2B (*Peptide Trnasporter 2*) a été localisé au niveau du tonoplaste par fusion à la GFP (Song *et al.* 1996). Il permet le transport de dipeptide de combinaison en acide aminés très varié ainsi que de nitrate (Song *et al.* 1996; Chiang *et al.*, 2004).

Des transporteurs d'acides aminés ont également été identifiés, 6 membres de la famille des *Amino Acid/Auxin Permease* (AAP) et 13 membres chez les *Amino Acid-Polyamine-organoCation* (APC) dont *Proline transporter 1* (PROT1 At2g39890). La proline est un acide aminé impliqué dans la réduction du stress salin (Rentsch *et al.*, 1996).

### c) Transporteurs d'élément minéraux

Dix transporteurs de métaux ont été identifiés : les transporteurs de fer, Nramp3 (At2g23150) dont la localisation vacuolaire a été confirmée par des expériences de fusion à la GFP (Thomine *et al.*, 2003), de même que son homologue Nramp 4 (At5g67330) et IRT3 (At1g60960). Le transporteur de cuivre COPT5 (At5g20650), deux transporteurs de zinc ZIF1 (At5g13740) et ZAT (At2g46800), les antiports  $H^+/Na^+$  NHX2 (At3g05030) et NHX3 (At3g06370), ou encore deux perméases l'une au potassium KuP5 (At4g33530) et l'autre aux sulfites TauE (At2g25737) ont également été identifiées.

Les échanges entre le pool de calcium vacuolaire et le cytosol sont largement mis en évidence par la présence de plusieurs ATPases permettant l'influx de calcium *via* l'hydrolyse d'ATP (ACA 4 - At2g41560, ACA 8 - At5g57110 et ACA 11 - At3g57330) et trois *Cation antiport exchanger* CAX (At3g51860, At2g38170, At1g53210) dont CAX 1 transporteurs de calcium et de cadmium (Hirschi *et al.*, 1996 ; Koren'kov *et al.*, 2007 ; Korenkov *et al.*, 2007b). Mais aussi par l'efflux de calcium vers le cytosol par la présence TCP1 (Furuichi *et al.*, 2001).

La dernière grande classe de transporteurs, identifiée dans nos travaux, est celle des canaux. Parmi-eux sont caractérisés : un *Voltage-gated Ion Channel* (VIC) transportant du potassium KAB1 (At1g04690), un *Ammonium transporter 2* (AMT2 - At2g38290) (Sohlenkamp *et al.*, 2002), trois *Small Conductance Mechanosensitive Ion Channel* (MscS5 - At3g14810, MscS6 - At1g78610 et MscS10 - At5g12080) (Haswell *et al.*, 2008) et un canal chlore (CLC-c - At5g49890). Par ailleurs nous identifions 4 *Voltage dependent anion channel* (VDAC1 à 4). Ces porines ont initialement été découvertes et localisées au niveau de la membrane mitochondriale (Lee, Hoang *et al.*, 2009). Mais de récents travaux ont montré par

des localisations *in vivo* de protéines fusionnées à la GFP que si VDAC 1 (At3g01280) et VDAC 3 (At5g15090) possèdent bien un signal d'adressage mitochondriale, VDAC 2 (At5g67500) et 4 (At5g57490) n'en possèdent pas et sont localisées au niveau d'autres organites du système sécrétoire. Par l'utilisation de mutants ils montrent que VDAC 2 et VDAC 4 ont un rôle important dans les phases de reproduction et de développement d'*Arabidopsis thaliana* (Tateda *et al.*, 2011).

#### d) *Transporteurs restants*

Parmi les transporteurs restants, 7 *Mitochondrial Carrier*, des sous-unités F de l'ATPase et 4 translocons mitochondriaux ou chloroplastiques sont identifiés. Plusieurs hypothèses sont possibles, il peut s'agir de contaminations ou de protéines en cours de dégradation au sein de la vacuole de par son rôle dans le système lytique.

### II.3.2 - Autres protéines

#### II.3.2.1 - Les protéines du trafic vésiculaire

Nos données indiquent que les protéines impliquées dans la fusion membranaire et le trafic vésiculaire constituent l'un des grands groupes fonctionnels vacuolaires (12 % - Figure 43). Ces 59 protéines sont plus enrichies dans la fraction strictement membranaire (48 protéines) que dans la fraction associée (11 protéines) (Tableau annexe / Figure 41). Dans cette catégorie, des sous-unités du complexe SNARE (*Soluble NSF Attachment protein Receptor*) (Uemura *et al.*, 2002), du complexe HOPS (*Homotypic fusion and Protein Sorting*) (Nickerson *et al.*, 2009), et du complexe protéique AtC-VPS (VCL1 - At2g38020 score 161, AtVPS11 - At2g05170 score 122 et AtVPS33 - At3g54860 score 176 ; Rojo *et al.* 2003) sont présentes. Ces complexes protéiques ont été prédits comme jouant un rôle direct dans la biogenèse vacuolaire et le trafic vésiculaire vers la vacuole dans les plantes par Rojo *et al.* (2003) (Tornerio *et al.*, 1996), et assure une spécificité membranaire (Bonifacino and Glick 2004).

La fusion de membranes dans le système endomembranaire suit un ordre défini d'événements: la membrane de la vésicule s'attache à sa cible par l'intermédiaire de protéines Rab (Epp *et al.*, 2011), les *N-ethylmaleimide-sensitive factor* (NSF) solubles sont assemblés à la membrane et reconnus par les récepteurs protéiques SNARE, les protéines du complexe HOPS viennent alors consolider la fixation et catalyser la fusion des bicouches lipidiques (Krämer and Ungermann 2011). Nous identifions trois NSF (GSNAP - At4g20410 score 722, ASNAP -

At3g56190 score 1608 et At4g04910 score 329), trois syntaxines qui sont des récepteurs SNARE (At5g46860 score 125, At1g79590 score 171 et At1g16240 score 565) et des *Vesicle-associated membrane protein* VAMP (VAMP 711 - At4g32150 score 345, VAMP 713 - At5g11150 score 314, VAMP 714 - At5g22360 score 205).

Nous avons identifié 9 membres de la famille COP (*coatmer adaptator protein*) dont 6 sous-unités du *coatmer protein complex*, ces protéines de manteau structurent les vésicules et permettent leur adressage. Nous identifions également des protéines impliquées dans l'excrétion telles que les membres du ESCRT III (*Escorting proteins to the vacuole*) : des *Vacuolar Protein Sorting* (VPS : At1g12470 - VPS 18, At1g08190 - VPS41) et des *Vacuolar sorting receptor* (VSR : At3g52850 - VSR 1, At2g05170 - VSR11) (Michelet *et al.*, 2010).

Ces protéines attestent des nombreux échanges entre la vacuole et les autres membres du système sécrétoire tels que le réticulum (Shahriari *et al.*, 2011 ; Schellmann and Pimpl 2009).

#### II.3.2.2 - Protéines de types Band 7

Les protéines de types Band 7 se caractérisent par la présence d'un domaine *Stomatin Prohibitin Flotilin Hbc* (SPFH). Nous identifions 12 des 19 protéines de type prohibitines / stomatines annotées dans le génome d'*Arabidopsis thaliana*. Les excellents scores ainsi que les meilleures valeurs de 'spectral count' spécifique des Band 7 dans la fraction membranaire stricte suggèrent leur forte liaison à la membrane, ce qui est appuyé par la prédiction d'un domaine transmembranaire ou d'un site de myristoylation pour 9 d'entre elles (Tableau IV). Ces protéines ont été, par exemple, retrouvées au niveau des rafts lipidiques (Salzer U and Prohaska R 2001 ; Hiller *et al.*, 2003). Un récent article a montré que 2 membres de la famille des Bands 7, HIR 1 et 2 (*Hypersensitive Induced Response*) forment un hétérodimère localisé au niveau des microdomaines membranaires pour médier le signal de la réponse hypersensible provenant du récepteur RPS2 (At4g26090) (Qi, Tsuda *et al.*, 2011) . La présence de deux tiers des membres des Band 7 annotés chez *Arabidopsis* dans la fraction membranaire de la vacuole suggère leur aspect fondamental dans les arrangements de microdomaines membranaires de type RAFT au niveau du tonoplaste. Les membres de cette famille pourraient contrôler des processus importants au sein de fonctions membranaires diverses et sans doute réguler la signalisation ou des mouvements des membranes.

**Tableau IV : Protéines à domaine SPFH identifiées dans la vacuole.** Le nom et le numéro AGI sont indiqués ainsi que le type de liaisons membranaires associant la protéine au tonoplaste. Les valeurs de score MASCOT, et le nombre de peptides identifiés (entre parenthèses) sont reportés ainsi que le 'spectral count' (SpC) spécifique

(uniquement des peptides protéotypiques). Parmi les références figurent Carter *et al.* (2004) (Ca), Shimaoka *et al.* (2004) (Sh) et Jaquinod *et al.* (2007) (Jaq).

Noms	Locus	Types de liaison membranaire	Tonoplaste		Refs
			Score (# pep.)	SpC spécifique	
Band 7 family protein	<i>At2g03510</i>	1 TMD	576 (11)	19	Jaq
Band 7 family protein	<i>At4g27585</i>	GPI-anchor	297 (5)	26	-
Band 7 family protein	<i>At5g54100</i>	—	270 (5)	17	-
Band 7 family protein (HIR1)	<i>At1g69840</i>	—	465 (7)	26	Ca, Sh, Jaq
Band 7 family protein (HIR2)	<i>At3g01290</i>	Palmitoylation	403 (6)	23	Sh, Jaq
Band 7 family protein (HIR3)	<i>At5g51570</i>	GPI-anchor	1017 (16)	87	Ca, Sh, Jaq
Band 7 family protein (HIR4)	<i>At5g62740</i>	Palmitoylation	873 (12)	59	Ca, Sh, Jaq
Prohibitin 1 (PHB1)	<i>At4g28510</i>	—	401 (6)	22	Sh, Jaq
Prohibitin 2 (PHB2)	<i>At1g03860</i>	1 TMD	606 (8)	32	Sh, Jaq
Prohibitin 3 (PHB3)	<i>At5g40770</i>	GPI-anchor	803 (10)	29	Ca, Sh, Jaq
Prohibitin 5 (PHB5)	<i>At3g27280</i>	GPI-anchor	654 (8)	17	Sh, Jaq
Prohibitin 6 (PHB6)	<i>At2g20530</i>	1 TMD	309 (4)	11	-

### II.3.2.3 - 14-3-3, Phosphatases, kinases et protéines G

Nos analyses protéomiques ont également révélé la présence de familles de protéines particulièrement intéressante pour leur rôle dans la signalisation cellulaire.

Ainsi, neuf protéines 14-3-3 ainsi qu'une *14-3-3-like* ont été identifiées dans la fraction membranaire et associée. Les 14-3-3 sont des protéines solubles dimériques. Elles forment une famille de protéines hautement conservées, identifiées chez toutes les espèces eucaryotes étudiées, elles sont probablement ubiquitaires. Initialement elles ont été décrites comme des protéines cérébrales abondantes et ont reçu leur nom numéroté de la 14<sup>ème</sup> fraction d'élution et des bandes de migration lors de leur extraction en 1967 (Moore *et al.*, 1967). Les protéines 14-3-3 sont reconnues comme des acteurs majeurs de la régulation cellulaire, impliquées dans de nombreux processus physiologiques (Oecking et Jaspert, 2009). Des centaines de protéines ont été identifiées comme des partenaires de liaison afin de réguler la transmission d'un signal ou l'activité d'une enzyme (Dougherty & Morrison, 2004). Dans de nombreux cas, les protéines partenaires montrent une nette préférence pour une isoforme particulière de 14-3-3. Chez les plantes, les 14-3-3 régulent la médiation et la signalisation de protéines telles que la nitrate réductase et de l'H<sup>+</sup> + ATPase plasmalemmique (Bunney *et al.*, 2002). Elles ont un rôle central de régulation de l'homéostasie ionique (ouverture de canaux calciques, van den Wijngaard *et al.*, 2001 ; et potassiques Latz *et al.*, 2007) et ont un rôle important dans la réponse aux brassinostéroïdes en y régulant plusieurs composants (Gampala *et al.*, 2007 ; de Vries, 2007).

La plupart des interactions des 14-3-3 avec leur cible a lieu principalement *via* la phosphorylation des sites de liaison sur des résidus sérine et thréonine situés dans un motif conservé. Dans certains cas, l'auto-phosphorylation des 14-3-3 peut moduler l'interaction. Neuf protéines 14-3-3 sont identifiées dans cette étude, sur 13 retrouvées dans l'ensemble du génome

d'*A. thaliana*. Potentiellement ces protéines 14-3-3 pourrait interagir avec des ligands présents dans le 'vacuome'. La vacuole est la plus grande réserve de phosphate de la cellule et l'acteur clé de l'homéostasie d'ions essentiels. Ces données suggèrent que les 14-3-3 sont des protéines clés du réseau vacuolaire et ouvrent des perspectives dans l'identification de partenaires de ces protéines.

Par exemple, la *Protein Phosphatase 2A* (PP2A) a été mise en évidence dans des complexes PP2A–14-3-3 (Sung *et al.*, 2005). Cette phosphatase par déphosphorylation du site de liaison module l'interaction entre une 14-3-3 et son partenaire (Ory *et al.*, 2003). Par ailleurs nous avons identifié 9 *Purple acid phosphatase*, dont la PAP 26 confirmée comme vacuolaire (Veljanovski *et al.*, 2006) augurant des voies de régulation à explorer.

La transmission du signal médié par l'action conjointe de PP2A et d'une 14-3-3 décrites par Ory *et al.* (2003) est effectuée par une protéine de type Ras (*Rat Sarcoma*). Cette famille de protéines est une sous-classe de protéines G, bien connues pour leur fonction dans les cascades de signalisation cellulaire. L'identification dans la fraction soluble de 27 protéines impliquées dans la signalisation de protéines de type G (15 Rab : *Ras-related GTP-binding*, 3 GDI : *Rab GDP dissociation inhibitor*, 7 PRA : *Prenylated rab acceptor*) ainsi que de dix 14-3-3, de 11 récepteurs de type LRR kinase, de 17 phosphatases et enfin de 13 kinases suggère l'existence d'un réseau de régulation de la signalisation élaboré au niveau de la vacuole.

#### II.3.2.4 - Autres protéines

Des composants de la Rubisco, un complexe de protéines solubles qui fonctionne dans le cycle de Calvin et que l'on croit être unique aux chloroplastes, ont été identifiés dans notre échantillon (AtCg00490, At5g38420 et At1g67090). Ces sous-unités de la Rubisco ont probablement été co-purifiées avec les protéines hydrophobes. Dans le passé la Rubisco a été montrée comme associée à des composants membranaires, mais probablement de manière aspécifique, même si elle n'est pas connue pour avoir une association à la membrane du chloroplaste (Seigneurin-Berny *et al.*, 1999). La présence de ces protéines peut résulter de la mobilisation partielle de chloroplastes sous forme de corps sphériques nommés Rubisco-containing bodies issus d'une invagination de la membrane externe chloroplastique et fusion avec la membrane vacuolaire (autophagie de la vacuole) (Ishida *et al.*, 2008). L'autophagie chez les plantes semble être un phénomène continu et la présence de Rubisco peut être largement induite par des événements de remodelage cellulaire survenant au cours du développement.

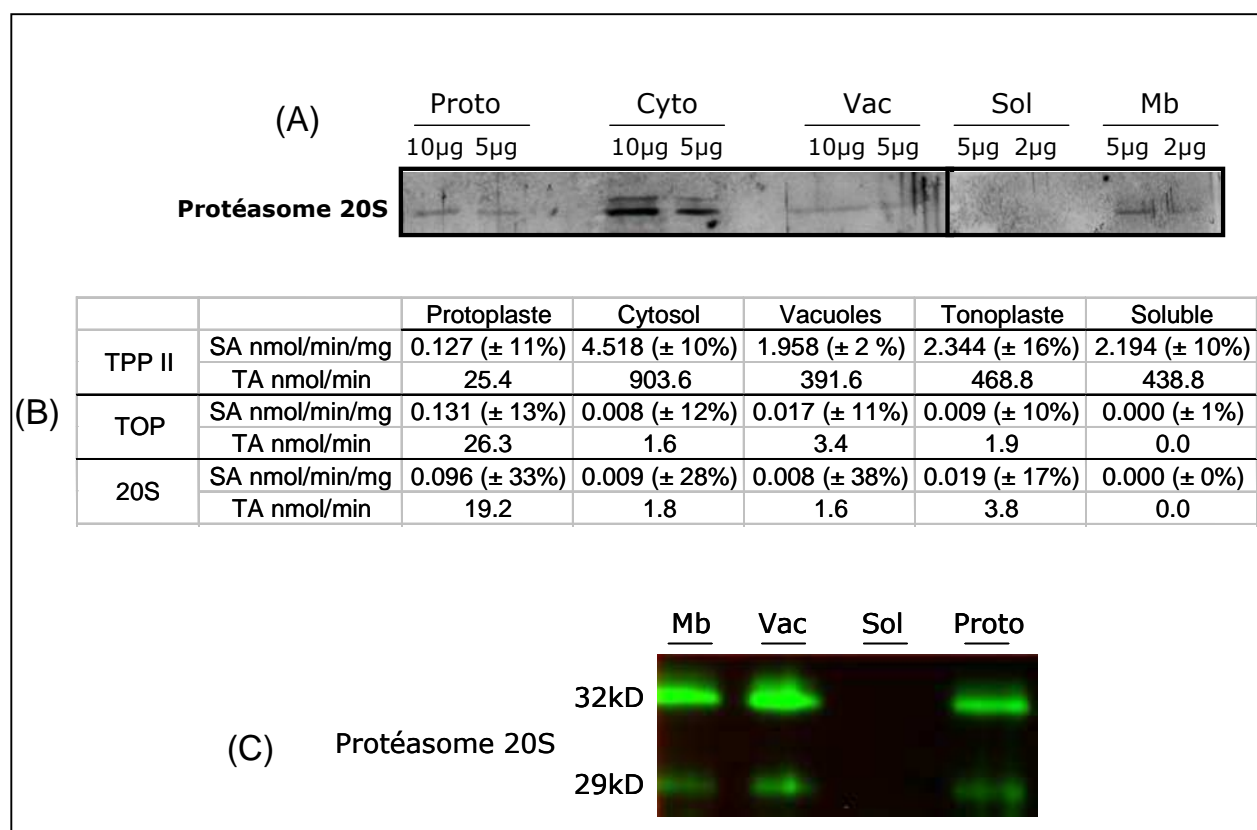


### II.3.3 - Quelques protéases particulières

Une large gamme de protéases a été détectée dans nos analyses, incluant des endo-et exoprotéases, des amino et carboxyl peptidases mais aussi des protéases à acide aspartique, cystéine, sérine et des métallo-protéases. Le plus surprenant est l'identification parmi elles de la tripeptidyl peptidase II, nommée TPP2 (At4g20850) comme l'une des composantes majeures de la fraction tonoplastique. Cette protéine qui appartient à la famille des subtilases, libère des tripeptides à l'extrémité libre N-terminale des peptides. Chez les eucaryotes, la tripeptidyl peptidase II est connue pour être une composante essentielle de la cascade protéolytique agissant en aval du protéasome 26S, dans la voie ubiquitine-protéasome de dégradation des protéines nucléaire et cytoplasmique. Compte tenu du lien potentiel entre TPPII avec la voie du protéasome Ub/26S, nos analyses sont en accord avec les précédentes tentatives de Book *et al* (2005) visant à purifier le protéasome 26S à partir de plantules d'*Arabidopsis*. Ils ont ainsi identifié un important complexe, jugé contaminant, dans la préparation finale qui contient deux protéines de 153 et 142 kDa. Le comportement des deux protéines (le protéasome 26S et TPPII), lors de la séparation, a permis de conclure que leur co-purification résulte principalement de la nature de leur superstructures et de la similarité en taille de leur forme native. L'analyse approfondie de la fraction membranaire révèle que le protéasome ainsi que des protéines associées au protéasome sont enrichies dans nos échantillons. La présence de ces protéases (protéasome 20S et TPPII) ainsi que de TOP (thimet oligopeptidase) a été étudiée dans les différentes fractions vacuolaires (soluble et membranaire) et le cytosol ; en réalisant des mesures d'activités avec des substrats spécifiques selon la méthode décrite dans Polge *et al.* (2009) (Figure 47B). La localisation sub-cellulaire du protéasome a également été évaluée par des immunorévélations (Figure 47-A et C).

Nos résultats indiquent clairement que le protéasome (activité spécifique =  $1,15 \mu\text{mol.h}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ ) ainsi que la subtilase (activité spécifique =  $1,58 \mu\text{mol.h}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ ) sont présents dans le lysat cellulaire total, ce qui implique une localisation cytoplasmique, confirmée par les immunorévélations (Figure 47-A). Mais ils révèlent également une activité du protéasome 20S au niveau de la vacuole (AS  $0,48 \text{ nmol.h}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ ) et de sa membrane (AS  $1,14 \text{ nmol.h}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ ) (Figure 47-B) alors qu'aucune activité n'est mesurée dans la fraction soluble. Les immunorévélations avec les deux anticorps dirigés contre le 20S confirmant les mesures d'activités (Figure 47-A et C). TOP observe le même comportement que le 20S dans les différentes fractions alors qu'on mesure un net enrichissement de TPP II dans le cytosol (AS  $54,2 \mu\text{mol.h}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ ) et dans les échantillons vacuolaires notamment tonoplastiques (AS  $28,1 \mu\text{mol.h}^{-1}.\text{min}^{-1}$ ). Dans le cas de TPP II, nous sommes parvenus à mesurer une activité dans la

fraction soluble (AS  $26,3 \mu\text{mol.h}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ ). Deux anticorps spécifiques dirigés contre TPP II ont été testés par Western Blot, mais sont restés sans résultats. La localisation de TPP II n'ayant pas pu être vérifiée par immunorévélation, nous ne pouvons affirmer sa présence à l'intérieur de la vacuole. TPP II est la protéine majoritaire dans nos échantillons, elle est identifiée dans toutes nos fractions vacuolaires mais avec la plus grande abondance dans la fraction membranaire associée (score membrane 8020, couverture de 60 % et spectral count spécifique de 2143). Lors de la lyse des vacuoles, une partie des protéines associées au tonoplaste du côté cytosolique passe dans la fraction soluble. TPP II étant très abondante, une large quantité se retrouve alors dans la fraction soluble expliquant les mesures d'activités dans la fraction soluble.



**Figure 47 : Evaluation de la présence et de l'activité des protéases (Protéasome 20 S, TPP II et TOP) dans les échantillons cellulaire et vacuolaire d'*Arabidopsis thaliana*.** (A) La localisation sub-cellulaire du protéasome 20S est évaluée par immunorévélation (Western Blot) avec un anticoprps anti-20S (fournit par R.Brouquisse de l'INRA d'Antibes). Les différents échantillons testés sont les protoplastes (Proto), le cytosol (cyto), les vacuoles (vac) et deux fractions vacuolaires, le soluble (sol) et les membranes (mb). (B) Le tableau regroupe les résultats d'essais enzymatiques menés selon Polge *et al.* (2009) pour 3 protéases : TPPII, TOP et le 20S. Avec SA pour activité spécifique et TA pour activité totale dans l'échantillon (C) La localisation sub-cellulaire du protéasome a été vérifiée avec un anticorp commercial (abcam) afin de mettre en évidence la présence spécifique du protéasome associé au tonoplate.

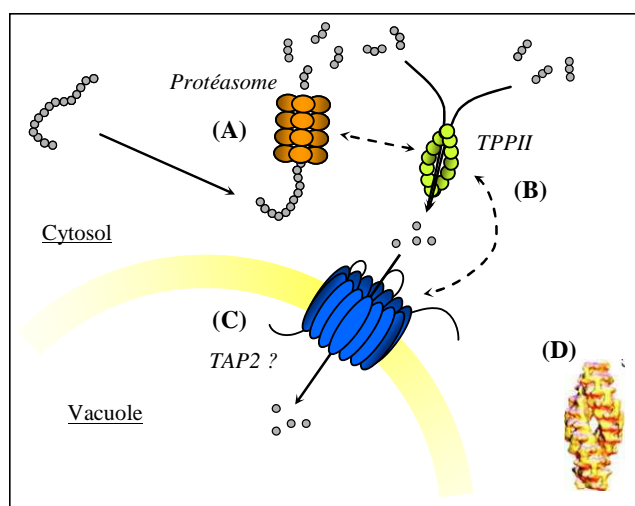
Nos résultats, en conformité avec les précédentes études montrant la présence du protéasome dans de nombreux compartiments subcellulaires eucaryotes (Coux *et al.*, 1996) et



plus particulièrement chez les plantes dans le cytoplasme, le noyau (Bahrami *et al.*, 2002) et l'ER (Kirst *et al.*, 2005), nous permettent d'étendre la localisation cellulaire de cette structure aux vacuoles, associée au tonoplaste. De plus, Desjardins et ses collaborateurs ont récemment montré en utilisant une analyse par immuno-fluorescence sur des phagosomes isolés une localisation du protéasome dans le cytoplasme et autour des phagosomes (Houde *et al.* 2003) et ont fourni la preuve que les protéines exogènes prises en charge par le protéasome sont ancrées sur la face cytoplasmique des phagosomes. Kleijnen *et al.* (2007) ont réalisés des études *in vivo* sur la morphologie vacuolaire à l'aide de différents mutants du protéasome pour chercher des preuves d'un dysfonctionnement de fusion de la membrane. Ils ont constaté qu'un mutant, rpt1-K<sub>256</sub>S, une des six ATPases appartenant aux particules de régulation du protéasome, a un phénotype *in vivo* de fragmentation vacuolaire. Leurs résultats confirment leur hypothèse, le protéasome serait impliqué dans la fusion membranaire *in vivo*, donc lié au tonoplaste. (Kleijnen *et al.*, 2007).

La subtilase TPP II agirait en aval du protéasome 26S, en clivant des tripeptides en position N-terminale de peptides plus longs. Comme dans les voies de dégradation de protéasome des cellules animales, la large gamme de protéases associées ou ancrées au tonoplaste pourrait aboutir à la dégradation totale des peptides en acides aminés libres (Saric *et al.*, 2007). Le recyclage des acides aminés produits par la dégradation des protéines est une fonction clé de la vacuole, qui peut contenir jusqu'à 65 fois plus d'acides aminés que les cellules intactes, et fournir du matériel de construction à la cellule.

Pour finir TPPII est connue chez les mammifères pour son rôle dans les processus de présentation de l'antigène. Elle est en interaction fréquente avec un transporteur ABC, TAP2, qui permet la translocation des peptides qu'elle génère vers la machinerie de synthèse du Complexe Majeur d'Histocompatibilité I (Kloetzel, 2004). L'homologue végétal de ce transporteur ayant été identifié par nos analyses (At5g39040 - score 923, SpC spécifique 117), il est très probable que son interaction potentielle avec TPPII et avec le protéasome explique la présence de ces protéines dans nos extraits.



**Figure 48 : Schéma organisationnel et fonctionnel possible du protéasome et de la subtilase TPPII (tripeptidylpeptidase II) chez *Arabidopsis thaliana*.** La copurification de ces protéines (TPPII et des sous-unités du protéasome) suggère leur interaction avec la membrane vacuolaire, probablement via leur liaison à des transporteurs du tonoplaste. Chez les mammifères, lors des processus conduisant à l'expression du complexe majeur d'histocompatibilité I, le protéasome est décrit pour être impliqué dans la première étape de dégradation des protéines intra-cellulaires en peptides de tailles réduites (A). Ceux-ci sont ensuite pris en charge par TPPII qui les hydrolyse plus avant (B) afin qu'ils soient pris en charge par TAP2 (C), un transporteur ABC localisé au réticulum endoplasmique. Un tel mécanisme de dégradation protéique pourrait également intervenir chez les plantes et impliquer la vacuole, le transporteur TAP2 ayant été identifié dans les fractions membranaires de nos échantillons. L'interaction potentielle entre les différents partenaires (flèches en pointillés) expliquerait alors la présence de sous-unités du protéasome et de TPPII dans nos échantillons. (D) : structure de la TPPII de drosophile, établie par Rockel *et al.*, (2005).

## II.4 - Conclusion sur l'analyse du protéome tonoplastique

Le travail d'analyse protéomique que nous avons réalisé a débouché sur l'identification de 1084 protéines membranaires ou associées à la membrane de la vacuole (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.** – Protéothèque), constituant l'étude la plus complète effectuée à ce jour sur le protéome tonoplastique. Les analyses effectuées par Szponarski *et al.* (2004) et Shimaoka *et al.* (2004) avaient débouché, respectivement, sur l'identification de 72 et de 163 protéines dans la fraction membranaire. Plus récemment, un travail original de localisation sub-cellulaire de protéines membranaires par tag isotopique a permis d'assigner 24 protéines à la vacuole (Dunkley *et al.*, 2006), et deux études réalisées sur des fractions enrichies en tonoplaste d'orge (Endler *et al.*, 2006) et sur des vacuoles intactes de chou-fleur (Schmidt *et al.*, 2007) ont abouti à l'identification de 88 et 316 protéines respectivement.

Notre stratégie d'analyse « divide and conquer » initialement appliquée dans Jaquinod *et al.*, (2007) par une analyse des protéines majoritaires directement extraites à chaud dans du

méthanol, sans fractionnement préalable par électrophorèse sur gel d'acrylamide, avait notamment permis d'identifier 110 transporteurs, dont 60 n'avaient pas été mis en évidence par les précédentes études. Dans le cadre de ma thèse, l'utilisation d'un fractionnement subcellulaire poussé, associée à une analyse des protéines par un instrument de haute précision très puissant ont notamment permis d'identifier 172 transporteurs, dont 83 n'avaient pas été mis en évidence par les précédentes études. Cette classe de protéines est particulièrement intéressante dans le cadre d'une recherche des éléments impliqués dans la séquestration vacuolaire des métaux lourds, et le fait que nous soyons capable de suivre, par spectrométrie de masse, plus de 70 % (172 / 236) des transporteurs localisés au tonoplaste par cette approche est un atout important pour la suite que nous souhaitons donner à ce travail.

Mais ces analyses font également ressortir un certain nombre de protéines généralement associées à d'autres compartiments cellulaires, principalement le cytosol. Plusieurs de ces protéines sont même identifiées avec un score important, ce qui est en particulier le cas de la subtilase TPPII, ou de plusieurs protéines du métabolisme primaire. Le protéasome, par exemple, est aussi étonnement bien représenté, à travers 14 sous-unités du 26S et 17 sous-unités du 20S différentes. L'identification de ces protéines est relativement surprenante et pourrait dans un premier temps être assimilée à du matériel contaminant. Or l'absence de contaminations d'origine mitochondriale, plasmalemmique et chloroplastiques lors des analyses par western-blot, les marqueurs recherchés étant tous membranaires, la faible contamination par des protéines cytosoliques (2DE IEF/SD-SPAGE) et la spécificité de l'enrichissement suivi par l'activité de l' $\alpha$ -mannosidase montrent qu'une copurification d'organites contaminants, tels que la mitochondrie ou le chloroplaste par exemple, sur les gradients utilisés est possible, mais semble néanmoins peu probable. Cependant, plusieurs hypothèses peuvent être envisagées pour expliquer ce phénomène d'identification de protéines non vacuolaires. C'est essentiellement dans les identifications faites à partir de la fraction associée à la membrane que le plus grand nombre de protéines connues pour être localisées dans d'autres compartiments apparaissent, ce déséquilibre suggérant l'absence de contaminants correspondant à des organites entiers. Le cas du réticulum endoplasmique peut être toutefois différent. Plusieurs protéines connues pour appartenir à cet organite (calréticulines CRT1 et CRT2 par exemple) ont été retrouvées, et leur identification pourrait être reliée à la présence de compartiments prévacuolaires d'origine endoplasmique dans les extraits, comme en témoigne par exemple la détection d'une protéine à motif HDEL, par western-blot, dans les échantillons vacuolaires.

La présence de nombreuses protéines cytosoliques telles que les sous-unités du protéasome suggère par contre que les contaminants observés puissent être associés à la vacuole du côté cytosolique, et co-purifiés avec les organites lors de leur isolement. Il est en effet possible que des protéines majoritaires du cytosol soient liées au tonoplaste de façon transitoire

et non spécifique, *via* des interactions hydrophobes par exemple. Mais ces associations peuvent également correspondre à une nécessité physiologique, et à des interactions spécifiques entre certaines protéines cytosoliques et des composants vacuolaires (membranes ou protéines). Afin de faire la lumière sur la localisation fine de ces protéines nous avons mis en place les approches de « shave and conquer ». Celles-ci consistent à réaliser une digestion par la protéinase K de vacuoles intactes afin de dégrader les protéines de la face externe des organites (Figure 40-C). Les vacuoles ainsi « rasées » ont été alors purifiées une nouvelle fois sur gradient de densité afin d'éliminer les peptides externes protéolysés. Les vacuoles ont été fractionnées en échantillons soluble et membranaire totale. Les échantillons de membranes soumis à l'action de la protéinase K (rasés) sont alors comparés avec ceux non soumis à l'action de l'enzyme (contrôles).

### ***III - « Shave and conquer »***

La membrane vacuolaire du côté cytoplasmique est engagée dans de nombreux processus enzymatiques. Pour déterminer quelles sont les protéines présentes dans la lumière de la vacuole et celles qui sont associées au côté cytoplasmique de ce compartiment, nous avons effectué une protection enzymatique de vacuoles intactes avec la protéinase K (Figure 40-C). En traitant les vacuoles, nous avons été capables d'induire la dégradation des protéines exposées partiellement ou totalement du côté cytoplasmique. Les protéines intégrales, associées vers ou dans la lumière de l'organite ont été protégées de l'action de la protéinase K par le tonoplaste. Nous nous concentrons ici exclusivement sur la fraction membranaire. Les données (Tableau V) suggèrent qu'une grande partie des protéines identifiées sont exposées à la surface cytosolique de la vacuole. La sélectivité de la protéolyse des protéines du côté exposé de la membrane de la vacuolaire, a été évaluée en suivant l'évolution du spectral count de protéines connues pour être du côté cytoplasmique, comme le complexe de la V-ATPase. Les sous unités V1 (VHA-A à VHA-H) localisées dans le cytoplasme et les V0 intégrales à la membrane (VHA-a, VHA-c, VHA-d) présente une baisse sévère de leurs SpC. Les mêmes observations sont faites pour la pyrophosphate (pompe à protons vacuolaires) (AVP-3, AT1G15690), l'annexine 1 (ANN1, AT1G35720) ou les transporteurs de complexes de glutathion (AtMRP1, AtMRP2, AtMRP4). Typiquement un transporteur ABC se compose de deux domaines transmembranaires et deux domaines cytoplasmiques de liaison aux nucléotides (NBD). Les analyses MS/MS permettent classiquement d'identifier les peptides situés dans les domaines NBD, or ces domaines sont clivés par l'action de la protéinase K rendant l'identification des MRP dans la fraction membranaire shave impossible.

**Tableau V : Résultats d'identification du Shave and Conquer.** Le nom et le numéro AGI sont indiqués ainsi que le type de liaisons membranaires associant la protéine au tonoplaste. Les valeurs de score MASCOT, le nombre de peptides identifiés, la couverture ainsi que le spectral count sont indiqués pour les échantillons shave « rasé » et témoin (contrôle).

Locus	Description des protéines	Liaisons membranaire	Shave score	Shave pep	Shave coverage	Shave spec.count	Tem score	Tem pep	Tem coverage	Tem spec. count
AT1G78900	V-ATPase A	Ass	793	10	15,7	80	4887	54	74,6	1300
AT1G76030	V-ATPase B	Ass					3813	44	62,1	721
AT1G12840	V-ATPase C	Ass	47	1	2,4	1	1414	21	53,3	203
AT3G58730	V-ATPase D	Ass					1174	17	45,6	103
AT4G11150	V-ATPase E	Ass					2297	29	76,5	272
AT3G42050	V-ATPase H	Ass	109	2	5,4	4	1356	16	33,1	225
AT4G39080	vacuolar V0-ATPase subunit AtVHA-a3	Ass	486	7	8,3	20	2859	39	41,5	778
AT2G16510	vacuolar V0-ATPase subunit AtVHA-c5	4 TMD	113	3	10,9	4	629	9	11,0	396
AT3G28710	vacuolar V0-ATPase subunit AtVHA-d1	Ass					1062	16	39,0	111
AT4G20850	Tripeptidyl-peptidase II (TPP-II)	Ass	1406	22	14,1	53	4430	58	37,2	1200
AT1G30400	glutathione-conjugate transporter (AtMRP1)	15TMD					2040	26	16,7	271
AT2G34660	glutathione-conjugate transporter (AtMRP2)	12TMD					1542	21	12,6	160
AT2G47800	glutathione-conjugate transporter (AtMRP4)	16TMD					2090	32	19,3	321
AT1G15690	type I proton-translocating pyrophosphatase (AVP-3)	16TMD	332	6	7,8	12	1929	25	29,7	424
AT3G19820	cell elongation protein / DWARF1 / DIMINUTO	1TMD	258	4	7,8	15	1192	18	25,5	362
AT1G56070	Elongation factor 2, putative		88	2	2,5	2	2711	37	32,9	312
AT5G02500	heat shock cognate 70 kDa protein 1 (HSC70-1)	GPI-anchor					2231	28	42,7	296
AT5G02490	heat shock cognate 70 kDa protein 2 (HSC70-2)	GPI-anchor					1490	18	26,8	201
AT3G09440	heat shock cognate 70 kDa protein 3 (HSC70-3)						1323	17	27,6	175
AT3G44300	nitrilase 2 (NIT2)						930	12	43,4	154
AT1G35720	annexin 1 (ANN1)	Ass					1207	18	52,4	136
AT5G42020	luminal binding protein 2 (BiP-2)	1TMD					1364	20	29,6	129
AT3G08530	clathrin heavy chain, putative	Ass					1038	16	10,8	122
AT5G42080	GTP-binding protein / phragmoplastin	Ass					1417	25	42,6	69
AT5G11150	synaptobrevin (VAMP713)	1TMD					238	4	20,8	5
AT3G02230	reversibly glycosylated polypeptide-1 (RGP1)						860	12	38,9	45
AT1G47128	cysteine proteinase (RD21A)	1TMD	369	6	13,0	34	732	10	19,3	105
AT3G14067	subtilase family protein TPPII		587	8	12,9	63	868	11	22,4	59
AT2G24200	cytosol aminopeptidase						986	14	36,2	101

AT1G11910	aspartyl protease family protein	1TMD					581	9	25,5	19
AT5G60160	aspartyl aminopeptidase, putative		66	1	1,9	2	633	9	25,2	39
AT2G20580	26S proteasome subunit RPN1A						572	10	12,6	45
AT1G20200	26S proteasome regulatory subunit S3						375	6	12,9	17
AT3G51260	20S proteasome AtPAD1						552	7	41,2	20
AT5G66140	20S proteasome AtPAD2						431	5	20,0	17
AT2G27020	20S proteasome AtPAG1						534	9	38,6	24
AT1G56450	20S proteasome AtPBG1						224	3	14,2	8
AT1G02305	cathepsin B-like cysteine protease	1TMD	380	6	16,9	29	689	8	24,9	18
AT1G09850	cysteine protease, papain-like (XBPC3)		344	4	12,1	50	320	5	11,7	16
AT4G16500	cysteine protease inhibitor family protein	1TMD	164	3	29,1	28	148	2	21,4	9
AT1G73260	Kunitz family protein	1TMD	122	2	7,9	2				
AT4G01610	cathepsin B-like cysteine protease, putative	1TMD	321	4	11,7	19	133	3	6,1	4
AT5G13980	putative alpha-mannosidase		302	5	4,5	35	711	12	8,9	48
AT3G26720	putative alpha-mannosidase	1TMD	715	11	12,0	63	898	15	15,8	56
AT5G10560	glycosyl hydrolase family 3 protein		297	5	6,4	17	368	6	8,6	13
AT4G39730	lipid-associated family protein, contains PLAT/LH2		182	3	17,1	34	190	3	17,1	26
AT1G54000	myrosinase-associated protein, putative	1TMD	460	6	14,8	60	799	11	31,5	24
AT2G33380	calcium-binding RD20 protein (RD20)	1TMD	719	11	38,1	36	353	6	30,9	18
AT3G56310	alpha-galactosidase, putative		268	4	13,0	31	237	3	10,8	16
AT2G22170	lipid-associated family protein	1TMD	115	2	10,4	29	110	2	10,4	12
AT1G78850	curculin-like (mannose-binding) lectin family protein		744	11	14,5	21	486	7	19,0	12
AT1G74010	strictosidine synthase family protein		377	6	17,8	15	213	2	13,5	6
AT5G54770	thiazole biosynthetic enzyme, chloroplast (ARA6)	TM Beta Barrel	236	3	7,7	8	88	1	3,7	2
AT2G40940	ethylene response sensor (ERS)	3TMD	121	2	1,6	26	51	1	1,6	2
AT1G22750	expressed protein	6TMD	92	2	4,0	11	39	1	4,0	2
AT5G56380	unknown protein	GPI-anchor	76	1	1,8	1				
AT5G10160	beta-hydroxyacyl-ACP dehydratase, putative		198	4	17,4	5				
AT5G08380	alpha-galactosidase, putative	1TMD	54	1	3,2	3				
AT4G12290	copper amine oxidase, putative,	1TMD	55	1	1,8	2				
AT3G28500	60S acidic ribosomal protein P2 (RPP2C)	GPI-anchor	135	2	12,2	3				
AT1G71880	sucrose-proton symporter (SUC1)	12TMD	89	2	4,7	2				
AT1G32400	expressed protein	4TMD	59	1	7,1	1				
AT1G18980	germin-like protein, putative	1TMD	53	1	5,5	1				

Toutes les protéines membranaires majeures de vacuoles isolées sur le premier gradient 5% sont donc dégradées lors de l'incubation avec la protéinase K (protéinase non spécifique). Les protéines doivent donc être exposées au moins partiellement ou temporairement à la surface cytosolique de la membrane si elles disparaissent d'analyses « shave ». Les Spectral count des protéines décrites cytosoliques et de la majorité des protéines probablement associées au tonoplaste ont chuté considérablement (Tableau V). La Subtilase TPPII (At4g20850), la nitrilase 2 (At3g44300), les isoformes de HSP70 (At5g02500, At5g02490, At3g09440), la chaîne lourde de la clathrine (At3g8530), la Luminal binding protein 2 (At5g42020) ou la protéine DWARF1/DIMINUTO (At3g19820), comme le montre leur sensibilité à la protéinase K (Tableau V), présumées pour être localisées du côté cytoplasmique de la vacuole sont belle et bien confirmées du côté cytosolique. Dans le cas de DIMINUTO/DWARF1 nos données sont conformes avec les précédents résultats de Battista *et al.* (1996) montrant que l'homologue humain de DIMINUTO/DWARF1 était essentiellement présent dans la membrane, les fractions du cytosquelette et, dans une moindre mesure, dans le cytosol. Depuis DIMINUTO/DWARF1 a été prédit comme possédant un segment transmembranaire putatif, l'enzyme est insérée dans la membrane et le reste cytosolique de la protéine est accessible à la protéolyse.

La localisation de protéases tels que les aspartyl protéases, les cystéines protéases est beaucoup plus délicate, car la vacuole est un compartiment lytique. Les résultats concernant le traitement à la protéinase K indiquent clairement que certaines protéines ont été protégées de l'activité protéolytique de la membrane entourant la vacuole. Ces observations confirment que les vacuoles 5% traitées sont encore intactes après l'action de la protéinase K et que les composants internes y sont protégés. Ainsi pour les protéines présentant les mêmes couvertures peptides et valeur de SpC, nous pouvons émettre l'hypothèse qu'elles ne disposent pas d'un fragment cytosolique et sont totalement protégées de l'action de la protéase. Pour exemples, les 2 protéines putatives, l'alpha-mannosidase (At3g26720), une lectine liant le mannose (At1g78860) sont faiblement ou pas du tout affectées par le traitement. Chez la levure après sa synthèse, l'alpha-mannosidase s'auto-assemble en oligomères, elle est ensuite recrutée vers la vacuole par la voie d'adressage (ctv) du cytoplasme à la vacuole, qui transporte des hydrolases résidentes telles que l'aminopeptidase I et l'alpha-mannosidase vers la vacuole (De, 2002). Ces protéases sont fortement concentrées sur la surface des vésicules et, contrairement à leurs formes solubles, ne diffusent pas et ne sont pas diluées ce qui explique leur présence au niveau vacuolaire avec des concentrations locales élevées. À la lumière de nos résultats, nous pouvons confirmer que de nombreuses protéases identifiées précédemment sont accessibles à la protéolyse. Comme par exemple aspartyl protéase (AT1G11910), l'aminopeptidase cytosolique (AT2G24200), TPPII (AT3G14067) et le protéasome totalement disparu, indiquant leur lieu de



résidence sur le côté cytoplasmique de la membrane. Le comportement de protéase et inhibiteurs de protéase tels que la cystéine protéase XBCP3 (AT1G09850) et celui de l'inhibiteur de la famille des cystéine protéases (At4g16500) sont diamétralement opposés le nombre de peptides et le SpC associé reste inchangé ou augmente respectivement indiquant que leur emplacement est probablement dans le lumen de la vacuole.

Par ailleurs, le traitement n'a eu aucun effet sur la calcium-binding protein (At2g33380). La calcium-binding protein (RD20) est codée par un gène d'*Arabidopsis* inducible par le stress qui appartient à la famille des caléosines. Des travaux précédents ont montré qu'AtClo-3 (At2g33380) était associée avec des fractions microsomales et l'enveloppe du chloroplaste, où elle présentait une orientation cytosolique de son extrémité C terminale d'environ 2 kDa (Partridge and Murphy 2009). Étant donné que la séquence de la protéine ne contient qu'un seul domaine transmembranaire prédit, l'extrémité N terminale a été protégée de la protéolyse. Il est difficile de savoir si la RD20 microsomale était dérivée de membranes du réticulum endoplasmique, du tonoplaste ou du plasmalemme mais les données actuelles confirment la présence de RD20 sur la membrane tonoplaste.

Enfin, nous avons identifié plusieurs protéines qui n'ont pas été vues dans les grands ensembles de données protéomiques. Leur sous-représentation pourrait être la conséquence de leur abondance relativement faible dans l'échantillon fractionné non rasé. Le protocole de « shave and conquer » appliqué a permis de réduire la complexité et la gamme dynamique élevée de l'échantillon, démasquant ainsi des protéines membranaires luminales ou associées de faible abondance. Parmi celles-ci, deux bêta-hydroxyacyl-ACP déshydratase putatifs sont suspectées. Ces deux enzymes sont annotées pour être localisées dans le chloroplaste (données de MS Ferro *et al.*, 2010 & Zybailov *et al.* 2008), mais elles ont également été identifiées dans les modèles de bactéries pour être impliquées dans la biosynthèse d'acides gras (Liu W *et al.* 2007; Kirkpatrick *et al* 2009). C'est aussi le cas d'une amine oxydase à cuivre putatif et d'une germin-like protein (At1g18980) qui apparaissent avec 1 domaine transmembranaire.

Compte tenu du nombre d'enzymes identifiées dans nos échantillons et des résultats obtenus par les expériences de « shave and conquer », il est évident qu'un grand nombre d'entre elles est situé sur la face cytosolique de la vacuole. Nous pouvons sans doute considérer le tonoplaste comme une plate-forme fonctionnelle permettant l'intégration de multiples étapes enzymatiques en un système de production de métabolites à grande échelle.

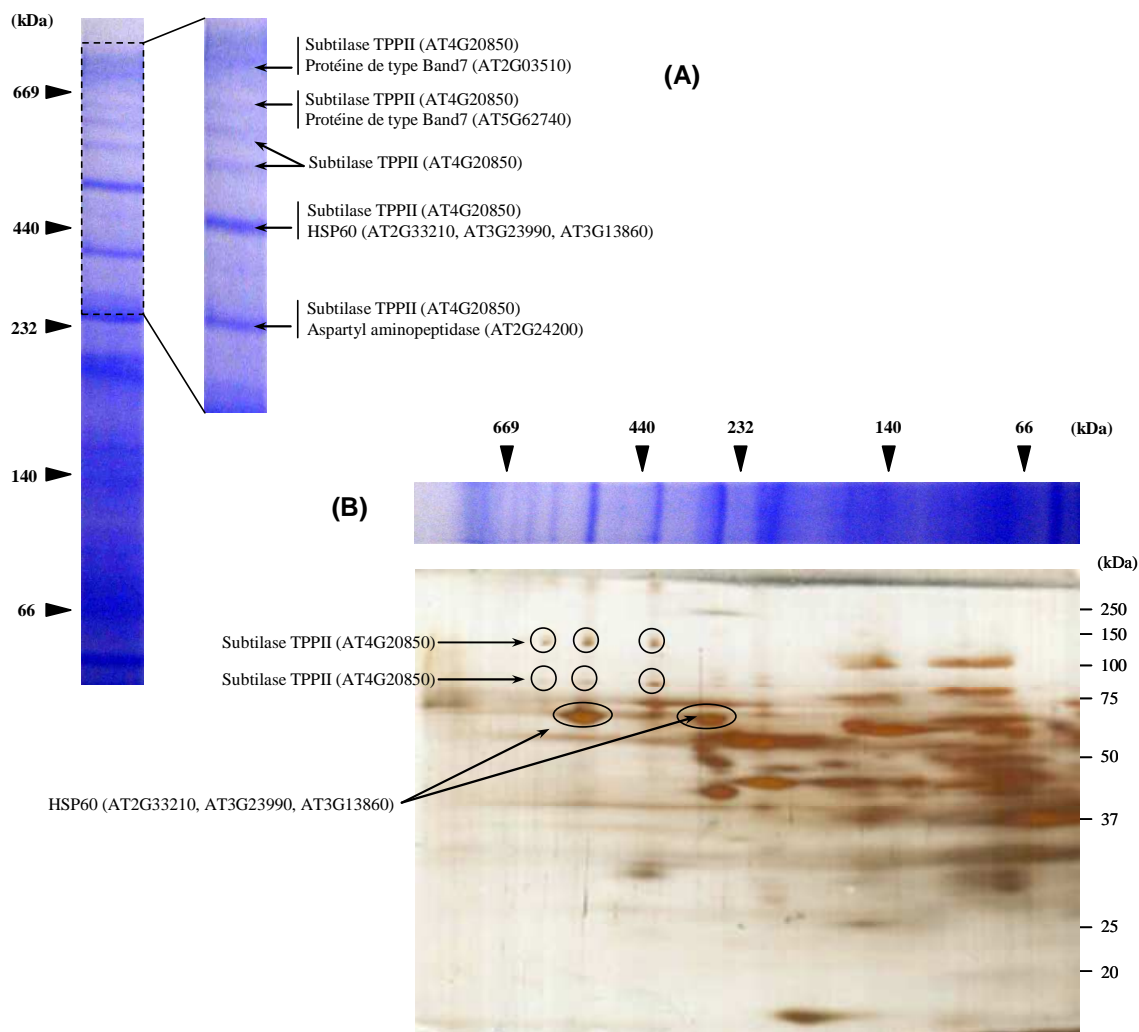


## **IV - Evaluation de l'organisation supramoléculaire du protéome vacuolaire**

Dans le but d'approfondir la caractérisation protéomique de la vacuole, nous avons réalisé un travail visant à identifier les complexes protéiques majeurs de la fraction membranaires de cet organite.

### **IV.1 - Evaluation de l'organisation supramoléculaire du protéome membranaire de la vacuole**

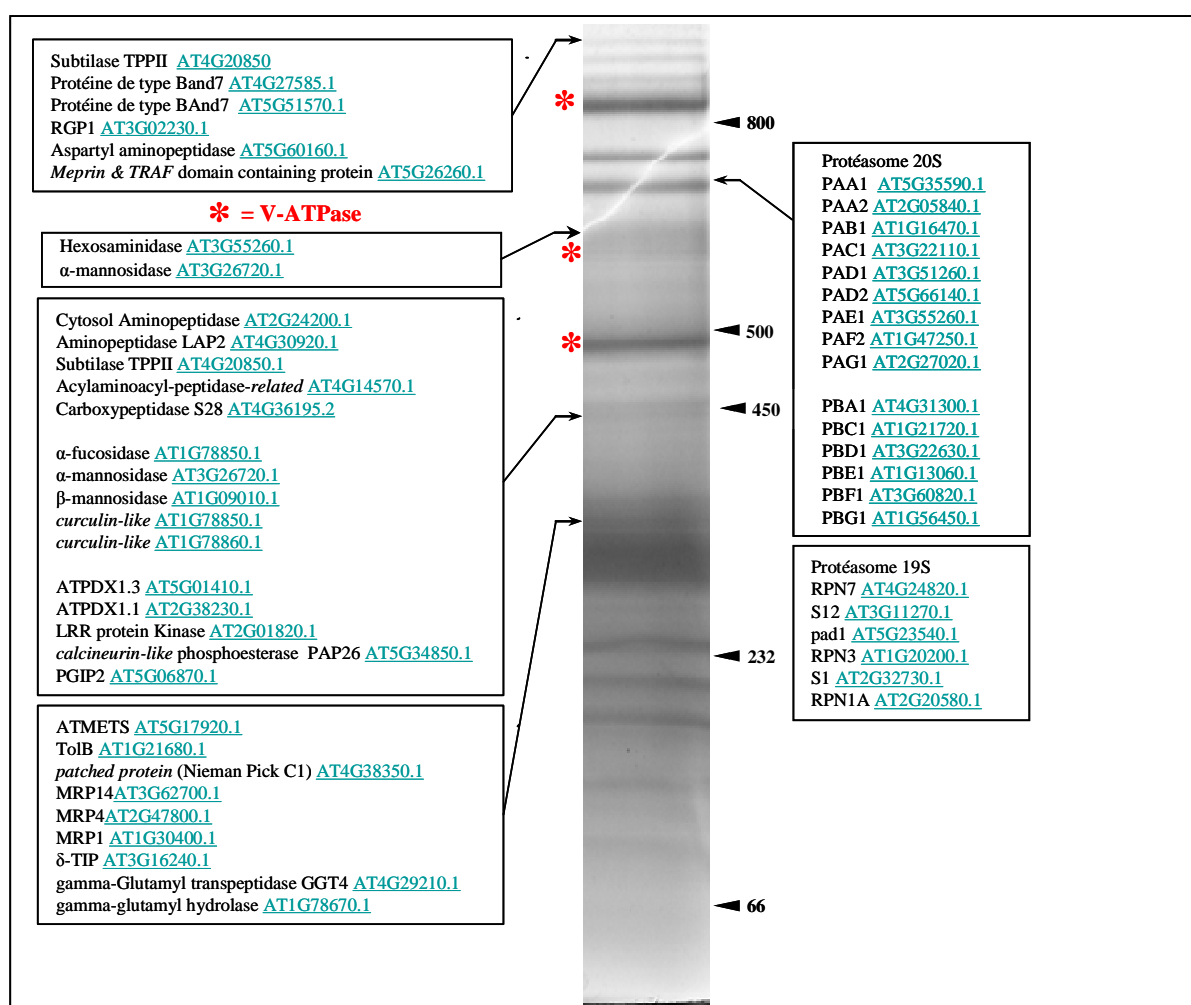
La préparation d'échantillons membranaires en vue de réaliser l'identification des complexes protéiques nécessite de mettre au point les conditions de solubilisation des protéines membranaires. Les conditions expérimentales pour réaliser ces BN-PAGE ont été mises au point par mon prédécesseur (Florent Villiers 2008). La première étape vers l'identification des complexes protéiques tonoplastiques a été de définir les meilleures conditions de préparation des membranes, permettant d'extraire le plus de protéines possibles sans toutefois dissocier les complexes. La solubilisation des membranes dans 10 % de dodécyl-maltoside (DDM) s'est révélée plus efficace que d'autres détergents. La composition des tampons (Imidazole initialement, cf. Matériels et méthodes) a été modifiée, et des électrophorèses de type BN-PAGE ont été réalisées dans des milieux constitués de Bis-Tris (Atteia *et al.*, 2003). Cette méthode a permis d'améliorer considérablement la résolution de la première dimension, et des bandes nettes, correspondant à des complexes putatifs de masses moléculaires supérieures à 500 kDa, ont pu être observées. Elles ont alors pu être analysées par spectrométrie de masse, ou utilisées pour réaliser une seconde dimension en conditions dénaturantes (Figure 49).



**Figure 49 : Electrophorèse bidimensionnelle de type BN / SDS-PAGE réalisée avec des échantillons membranaires de vacuoles.** (A) : la première dimension, consistant en une électrophorèse en conditions non dénaturantes, permet d'observer des bandes de hauts poids moléculaires (supérieures à 500 kDa), relativement bien résolues et séparées les une des autres. Leur analyse, par spectrométrie de masse, a permis d'identifier la subtilase TPPII dans chacune des bandes, éventuellement associées à d'autres protéines telles des chaperonnes (HSP60) ou des protéines de type Band7. (B) : la seconde dimension, en conditions dénaturantes, permet de séparer les constituants protéiques des complexes et révèle la présence de 2 isoformes de TPPII, à des poids moléculaires différents.

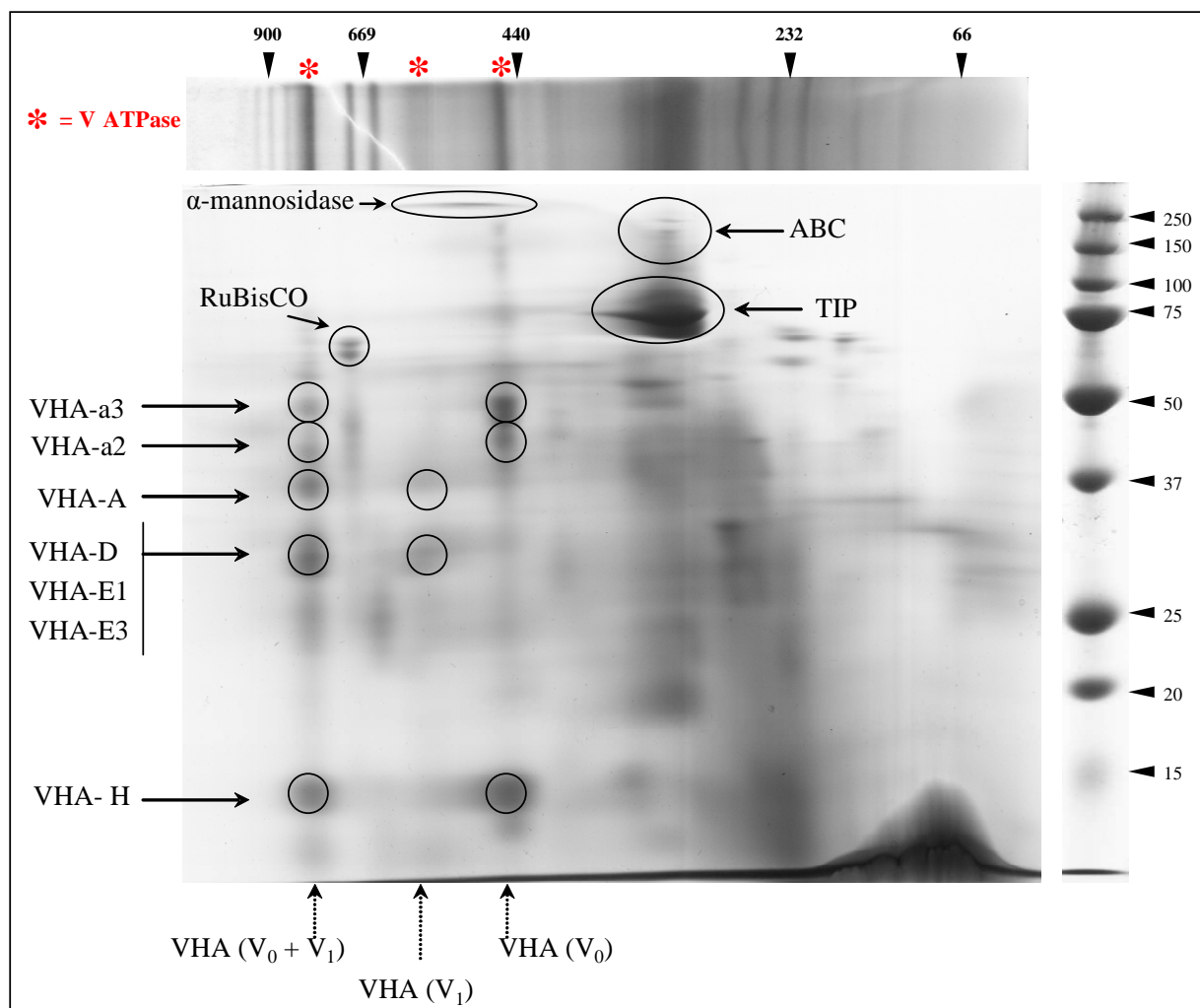
Sur les premiers BN-PAGE de la fraction membranaire, de façon surprenante, l'ATPase vacuolaire, à l'inverse de TPPII, est très faiblement représentée dans cette analyse des complexes. Quelques sous-unités de la V-ATPase ont pu être identifiées dans des spots non résolus de la seconde dimension (trainées). Ce phénomène évoque une dégradation des complexes dans la première dimension. L'absence d'une bande nette dans la première dimension, correspondant à la V-ATPase, l'un des complexes les plus représentés de la vacuole, nous a poussé à effectuer une analyse des protéines vacuolaires sans fractionnement préalable

des échantillons solubles et membranaires, et sans congélation avant électrophorèse. L'idée étant de préserver au maximum l'intégrité des complexes avant leur migration en condition native. Des vacuoles purifiées sur un gradient de Ficoll 5 % ont été directement utilisées. Cette purification, moins stringente que celle habituellement réalisée, nous a permis d'obtenir en une seule préparation la quantité de protéines suffisante à la réalisation du BN-PAGE (Figure 50 et Figure 51). Cette méthode utilisant un échantillon vacuolaire total devait nous permettre de visualiser les complexes majoritaires de la vacuole. Effectivement, cette nouvelle expérience de BN-PAGE vacuolaire nous a permis d'observer la V-ATPase, présente dans 3 bandes distinctes dans la première dimension (Figure 50 et Figure 51). Celles-ci correspondent à la V-ATPase entière, dont la quasi-totalité des sous-unités (VHA-A, VHA-B1, VHA-B2, VHA-C, VHA-D, VHA-E1, VHA-E3, VHA-F, VHA-G2, VHA-H, VHA-a3 VHA-c2, VHA-d1) a pu être identifiée, au domaine V1 seul, et au domaine V0 seul.



**Figure 50 : Séparation des protéines vacuolaires par BN-PAGE.** 150  $\mu$ g d'échantillons vacuolaires totaux ont été solubilisés dans du dodécyl-maltoside (10 % [p/v]), et ont fait l'objet d'une électrophorèse de type BN-PAGE sur gradient d'acrylamide (5 % - 13 %) afin de séparer les complexes. La piste de migration a été colorée au bleu de Coomassie G250, et les bandes majeures ont été découpées et analysées par spectrométrie de masse. Les résultats des analyses sont indiqués sur la figure.

Dans la seconde dimension Figure 51 on retrouve ces 3 bandes V-ATPase entière, domaine V1 seul, et domaine V0 seul. Les complexes sont alors dissociés et les différentes sous-unités sont résolues et identifiées dans des spots distincts.



**Figure 51 : Séparation des protéines vacuolaires par BN / SDS-PAGE.** 200  $\mu$ g d'échantillons vacuolaires totaux ont été solubilisés dans 10 % [p/v] de dodécyl-maltoside, et ont fait l'objet d'une électrophorèse de type BN-PAGE sur gradient d'acrylamide (5 % - 13 %) afin de séparer les complexes. La piste de migration a alors été placée au sommet d'un gel de type SDS-PAGE afin de séparer les protéines composant les complexes. La seconde dimension est colorée au nitrate d'Argent.

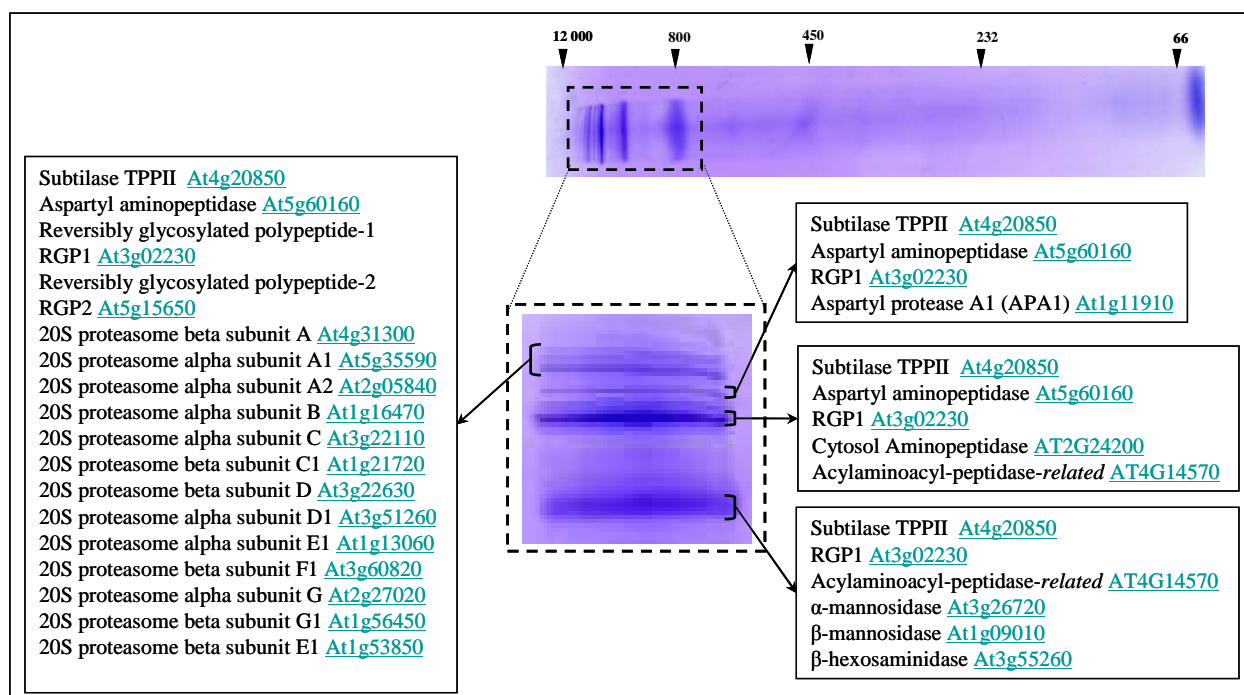
De façon intéressante, nous identifions dans la première dimension (Figure 50) l'association de la subtilase TPPII avec des protéines de type Band7 caractérisées précédemment (At4g27585 et At5g51570). D'autres protéases telles que des aspartyl aminopeptidases, ou des protéines à domaine « Meprin & TRAF », connues pour leur présence au sein de complexes de haut poids moléculaire, sont aussi présentes. Ces associations de protéines seraient représentatives de processus de dégradations protéiques successifs rattachées

à la membrane. Dans certaines bandes (Figure 50), la quasi-totalité des sous-unités du protéasome 20S a pu être identifiée, ainsi qu'une grande partie des protéines composant le protéasome 19S, ces résultats confirment l'association du protéasome au niveau de la vacuole.

L' $\alpha$ -mannosidase, notre enzyme de référence vacuolaire est également identifiée. Elle apparaît minoritaire au sein des différentes protéines représentées, notamment les transporteurs, et illustre la faible proportion de protéines soluble dans le 'vacuome'. Parmi les transporteurs, la présence de l'aquaporine TIP2.1 (*Tonoplast Intrinsic Protein*) est illustrée par un large spot. La TIP2.1 est l'aquaporine la mieux identifiée dans la fraction membranaire avec un 'spectral count' spécifique de 471. Elle très probablement majoritaire dans le protéome tonoplastique de nos lignées cellulaires. Dans la première dimension la gamma TIP apparaît dans des structures d'environ 300 kDa (Figure 50). La TIP est connue pour s'associer sous forme multimérique dans des complexes suffisamment stables pour résister à la dénaturation par le SDS (passage 1<sup>ère</sup> - 2<sup>ème</sup> dimension) (Vander Willigen *et al.*, 2006). Le spot identifié dans la seconde dimension correspond donc à un trimère de 75 kDa. Si l'on en revient à la première dimension les TIP formeraient des dodécamères, des ultrastructures. Toutefois dans la même bande de la première dimension nous identifions également 3 transporteurs de type ABC (MRP1, MRP2 et MRP14) mais aussi une gamma-glutamyl transpeptidase et une gamma-glutamyl hydrolase. La gamma TIP sous forme de trimère s'associerait à des protéines impliqués dans le transport des conjugués du glutathion et des enzymes susceptibles de les dégrader. Cette possible association de protéines, impliquées dans des processus de détoxification vacuolaire, en une même structure, serait révélatrice d'un réseau particulièrement intéressant aux vues des problématiques que nous étudions.

Pour confirmer la présence du dégradosome (protéasome –TPPII) dans les échantillons vacuolaires, un BN-PAGE de la fraction soluble associée à la membrane a été réalisé (Figure 52). La séparation électrophorétique en condition native de l'échantillon de protéines vacuolaires solubles associées à la membrane permet de mettre en évidence l'association protéasome –TPPII. Ces résultats étayent une fois de plus la co-purification de ce complexe de protéases avec la vacuole et leur très probable association au tonoplaste.

Les autres complexes protéiques putatifs, similaires à ceux déjà identifiés lors des BN-PAGE soluble et membranaire (Figure 50), confortent les résultats précédemment obtenues. Ils semblent confirmer que des protéases (subtilase, aminopeptidases ...) seraient associées à des glycosidases (RGP, GH38 et GH20) pour former des structures enzymatiques collaboratives au niveau des vacuoles.



**Figure 52 : Séparation des protéines soluble associées à la membrane par BN-PAGE.** 150  $\mu$ g d'échantillons ont fait l'objet d'une électrophorèse de type BN-PAGE sur gradient d'acrylamide (5 % - 13 %) afin de séparer les complexes. La piste de migration a été colorée au bleu de Coomassie G250, et les bandes majeures ont été découpées et analysées par spectrométrie de masse. Les résultats des analyses sont indiqués sur la figure.

## IV.2 - Conclusion

Nos travaux ont permis de mettre en évidence pour la première fois des complexes majeurs vacuolaires à l'instar de ceux observés par des analyses de type BN-PAGE sur des organites tels que la mitochondrie ou le chloroplaste (Schagger & Pfeiffer, 2000 ; Heinemeyer *et al.*, 2004). L'utilisation des gels natifs, combinée à une deuxième dimension en condition dénaturante, nous a permis de mettre en évidence plusieurs complexes putatifs. Bien que la réalité physiologique, des associations supposées, reste à confirmer par d'autres approches, l'utilisation des BN-PAGE dans ce travail a permis de mettre en évidence des associations protéiques abondantes et structurées.

L'estimation de l'organisation supramoléculaire du protéome vacuolaire par BN / SDS-PAGE nous a permis de mettre en évidence le complexe de la V-ATPase. Les différentes identifications de l'ATPase, entière ou des domaines V0 ou V1 seuls, ainsi que la présence de sous-unités dans des complexes protéiques de tailles différentes suggèrent une faible cohésion des différentes sous-unités qui compose l'ATPase vacuolaire. Ces analyses nous ont également permis de mettre en évidence un certain nombre d'interactions potentielles entre plusieurs glycosidases sans doute organisées autour d'un dimère d' $\alpha$ -mannosidase. Certaines protéases

semblent également impliquées dans des superstructures protéolytiques et seraient potentiellement associées à des protéines régulatrices de liaisons à la membrane comme des Band 7 ou des protéines à domaine « Meprin & TRAF ». Enfin cette approche nous a également permis de confirmer des associations de protéases suggérées par nos précédentes analyses. Il s'agit du complexe que nous avons nommé dégradosome composé du protéasome et de la subtilase TPPII.

Toutefois, les constituants exacts de ces complexes putatifs n'ont pu être précisément déterminés, de même que leurs proportions relatives. Un tel travail nécessite une approche ciblée, sur chaque complexe potentiel, dans le but d'une caractérisation poussée visant à en identifier précisément leurs constituants.

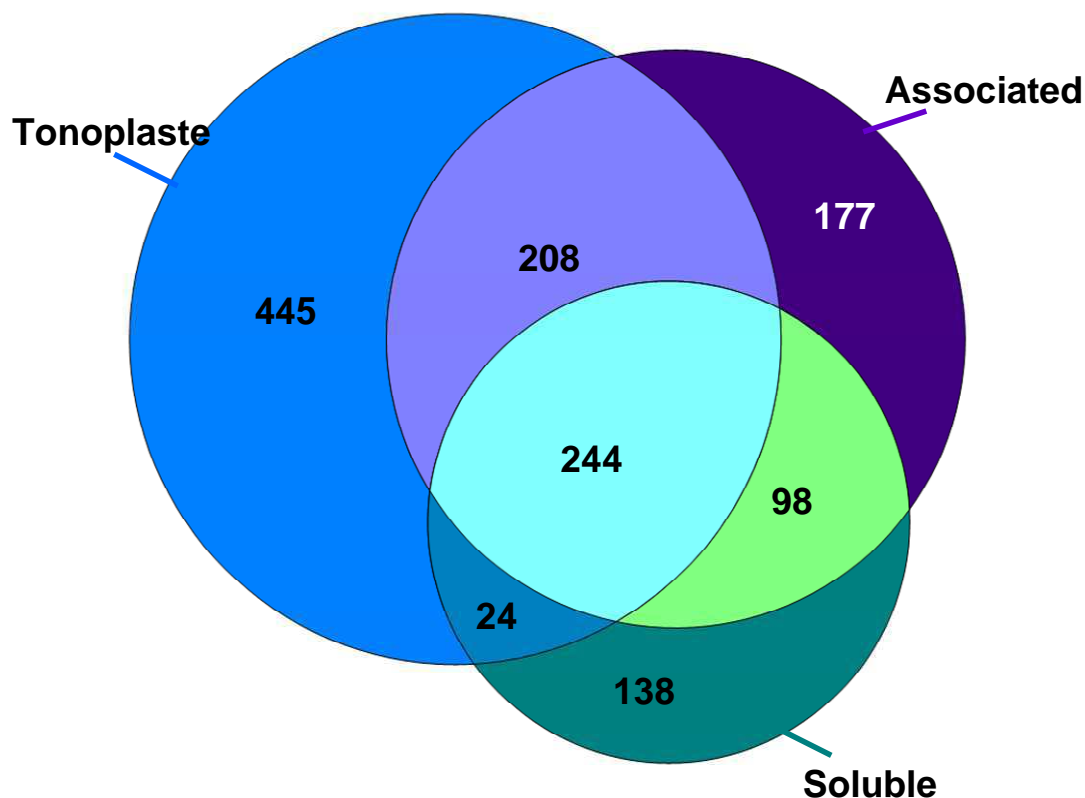


## ***V - Conclusion chapitre I et II***

Au fil de la présentation des résultats de protéomique (Chapitres I et II), certaines protéines ont été mentionnées comme ayant été décrites pour leur localisation autre que vacuolaire. C'est notamment le cas de plusieurs protéases (sous-unités du protéasome, subtilase TPPII ...), de protéines de la réponse au stress (GST, peroxydases ...), de protéines de la signalisation (14-3-3 ...). Leur présence soulève la question d'une éventuelle contamination par d'autres compartiments cellulaires, bien que les différents contrôles qualité aient démontré l'absence de mitochondrie, de chloroplaste et de plasmalemmes dans nos échantillons. Les analyses de « shave and conquer » de la fraction soluble et membranaire ont clairement mis en évidence qu'un grand nombre de protéines identifiées sont en réalité associées au tonoplaste du côté cytosolique. Les contaminants potentiels mis en évidence ont été principalement identifiés dans la fraction soluble des vacuoles. La présence de ces protéines contaminantes pourrait résulter de processus autophagiques, qui conduisent à l'internalisation dans la vacuole de fractions entières de cytoplasme, ces protéines étant alors en cours de dégradation par les protéases vacuolaires.

Ce travail de protéomique vacuolaire a permis d'identifier 1084 protéines non redondantes dans nos échantillons dont 244 communes aux trois échantillons (Figure 53). La majorité de ces protéines sont identifiées dans la fraction membranaire certainement de part les multiples liaisons membranaires possibles favorisant la diversité des protéines identifiées. L'ensemble de ce travail a permis de mettre en évidence de nombreuses protéines impliquées dans le fonctionnement de la vacuole (enzymes et transporteurs) et dans son interaction cellulaire (transduction et signalisation, trafic vésiculaire), en particulier avec le cytosol et le réticulum endoplasmique. Le vacuome ouvre les perspectives d'une meilleure compréhension du rôle de la vacuole, en particulier sa réponse lors d'un stress. Des questions se posent quand à l'identification des voies de la détoxification métallique.





**Figure 53 : Diagramme de Venn croisant les identifications réalisées dans les 3 fractions vacuolaire, le tonoplaste, les protéines associées et le soluble correspondant. Le vacuome s'étend alors à 1334 protéines non redondantes.**

L'exploitation des données de spectrométrie nous a permis d'aboutir à une caractérisation approfondie du protéome vacuolaire soluble et membranaire. Ces travaux font l'objet de deux publications qui doivent être soumises très prochainement intitulée :

An unexpected metabolic and signalling network linking the vacuole and the cytosol of *Arabidopsis thaliana* revealed by proteomics dissection. F. Villiers\*, **N. Jarno\***, M. Jaquinod, L. Kuhn, M. Nicaise, A. Jourdain, T. Rabilloud, C. Bruley, J.Garin and J. Bourguignon. (Article présenté dans le chapitre 1)

New insights into the composition and molecular mass of the protein complexes of plant tonoplast, Identification and characterization of tonoplastic-associated degradation proteins. **N. Jarno\***, F. Villiers\*, S. Kieffer-Jaquinod, A. Jourdain, C. Bruley, J. Garin, J. Bourguignon and M. Jaquinod.



# Chapitre III : Dynamique du protéome vacuolaire lors d'un stress engendré par le cadmium

Ce chapitre traite de la méthodologie mise en place pour étudier le rôle de la vacuole dans la détoxification du cadmium ainsi que l'impact de ce métal sur ce compartiment cellulaire.

<b>I -</b>	<b>DYNAMIQUE DU PROTEOME VACUOLAIRE SANS A PRIORI .....</b>	<b>227</b>
<b>II -</b>	<b>RECHERCHE DE PROTEINES VACUOLAIRES PRESENTANT UNE REGULATION TRANSCRIPTIONNELLE PAR LE CADMIUM .....</b>	<b>246</b>
<b>III -</b>	<b>DYNAMIQUE DU PROTEOME VACUOLAIRE CIBLEE.....</b>	<b>256</b>

L'objectif des recherches menées par l'équipe « Réponse de la Plante aux Stress Environnementaux et Métaux Lourds » est d'étudier la réponse de la plante face à un stress métallique. Des approches globales combinées à des actions plus ciblées de génétique et de biochimie sont utilisées pour analyser la perception du stress métallique par la cellule végétale et la cascade d'évènements mise en place pour lutter contre celui-ci. L'étude de la réponse d'*Arabidopsis thaliana* face au cadmium a en premier lieu été explorée par des approches globales d'analyses :

- i. transcriptomique sur les feuilles et les racines (Herbette *et al.*, 2006) ;
- ii. protéomique par électrophorèses bidimensionnelles de la réponse cellulaire (Sarry *et al.*, 2006)
- iii. métabolomique par l'étude des chélateurs de cadmium (Ducruix *et al.*, 2006)

Les travaux réalisés à l'aide de l'électrophorèse bidimensionnelle ont d'ailleurs mis en évidence que la SBP1 (*Selenium Binding Protein 1*) aurait un rôle dans la détoxification des métaux. Cette fonction a été confirmée par des méthodes de génétique et de biochimie révélant l'implication de SBP1 dans la détoxification du cadmium, sélénium (VI), du cuivre, et de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> *in planta* (Duteuil *et al.*, 2008 ; Hugouvieux *et al.* 2009).

Dans la cellule végétale, la vacuole est incontestablement identifiée comme le site privilégié de stockage de composés divers. Elle intervient tout autant dans le maintien précis de l'homéostasie des ions ou molécules essentielles que dans la séquestration de toxiques, en particulier de certains métaux lourds. Plusieurs publications font état de l'accumulation des ions métalliques (cadmium en particulier) dans la vacuole au cours d'un stress (Clemens 2006 ; Hall 2002), et il est généralement admis que cette compartimentation assure une protection de la plante, tout au moins à l'échelle cellulaire (cf. Introduction). Cependant, les mécanismes conduisant à cette séquestration à l'initiative de ces travaux étaient méconnus. Dans le but de préciser le rôle de la vacuole et d'en établir les acteurs protéiques, en particulier les transporteurs chargés de la translocation des ions métalliques, nous avons mis en place une approche protéomique. Cette identification exhaustive des protéines de la vacuole nous a permis de mieux caractériser cet organite. Fort de ces connaissances, nous avons choisi d'appréhender les mécanismes de détoxification du cadmium par une étude de la dynamique du protéome vacuolaire.

La méthodologie mise en place vise à comparer un extrait protéique vacuolaire contrôle avec un extrait produit en condition de stress cadmium. L'échantillon contrôle, qui sert de témoin ou de référent, correspond à des cellules d'*Arabidopsis* ayant poussé en condition optimale de croissance. L'échantillon stress correspond à des cellules poussant dans des conditions de croissance similaires auxquels sont ajoutés des sels de cadmium pendant une durée et une concentration choisies. La comparaison de ces différentes conditions expérimentales doit nous permettre de comprendre comment la cellule s'adapte au stress généré par le cadmium non essentiel. Plusieurs approches ont été explorées pour tenter *in fine* de comprendre ces mécanismes.

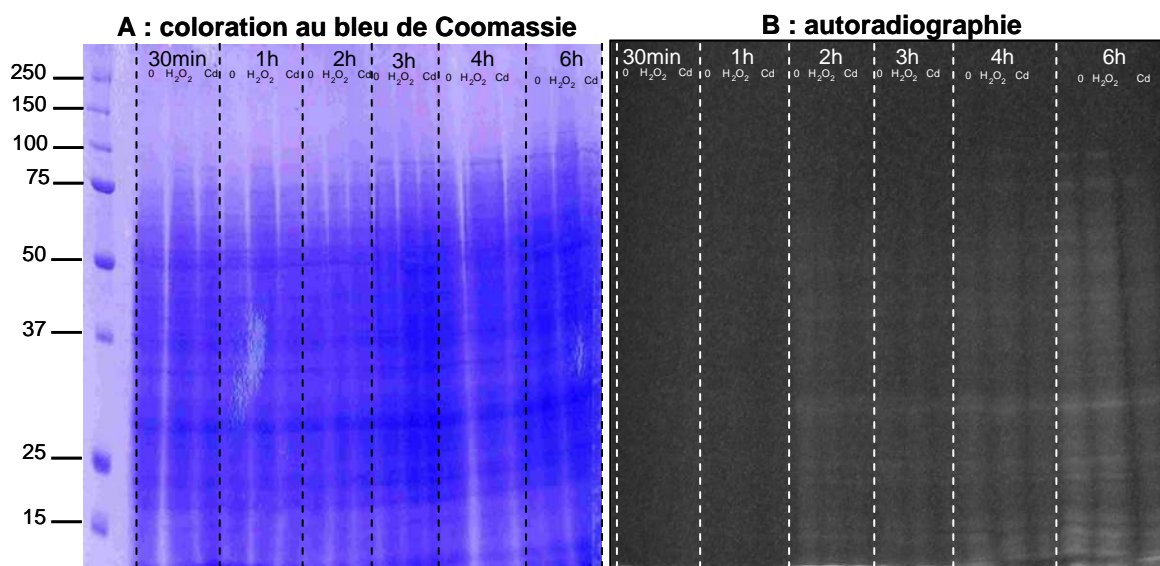
## ***I - Dynamique du protéome vacuolaire sans a priori***

Une approche sans *a priori* ne tient pas compte des résultats des expérimentations antérieures au sujet d'étude. Les méthodologies choisies sont systématiquement exploratoires. Afin d'explorer la dynamique du protéome sans *a priori*, nous avons choisi dans un premier temps d'utiliser des électrophorèses bidimensionnelles puis nous avons opté pour le marquage métabolique.

## **I.1 - Quantification par analyse électrophorétique à deux dimensions (IEF/SDS-PAGE)**

### **I.1.1 - Electrophorèse 2D avec marquage au soufre radioactif**

En collaboration avec Thierry Rabilloud du laboratoire BBSI (Cea Grenoble), une cartographie par IEF/SDS-PAGE des sucs vacuolaires à été menée. Cette procédure a permis l'identification de 99 protéines non redondantes présentes dans 187 spots analysés. Fort de cette expérience, nous avons choisi dans un premier temps d'évaluer l'impact du stress cadmium par le même type d'approche. Nous avons donc choisi de réaliser de nouveaux gels d'électrophorèses bidimensionnelles d'échantillons de sucs vacuolaire contrôle et stress cadmium. Afin de suivre l'évolution du protéome, j'ai réalisé une électrophorèse avec marquage par un isotope du soufre, le  $S^{35}$  (isotope à rayonnement bêta de faible énergie), qui est incorporé au niveau des méthionines et cystéines. J'ai réalisé les premiers tests sur des protoplastes en comparant trois conditions expérimentales : le contrôle, un échantillon traité avec 50  $\mu M$  de cadmium pour mimer un stress cadmium et un échantillon traité avec de l' $H_2O_2$  10 % finale pour mimer un stress oxydant. Une cinétique a été effectuée et des mesures de radioactivité ont été prises à 30 min, 1h, 2h, 3h, 4h, 6h et 20h. Des aliquotes à chaque point de la cinétique ont été déposés sur gel (Figure 54).



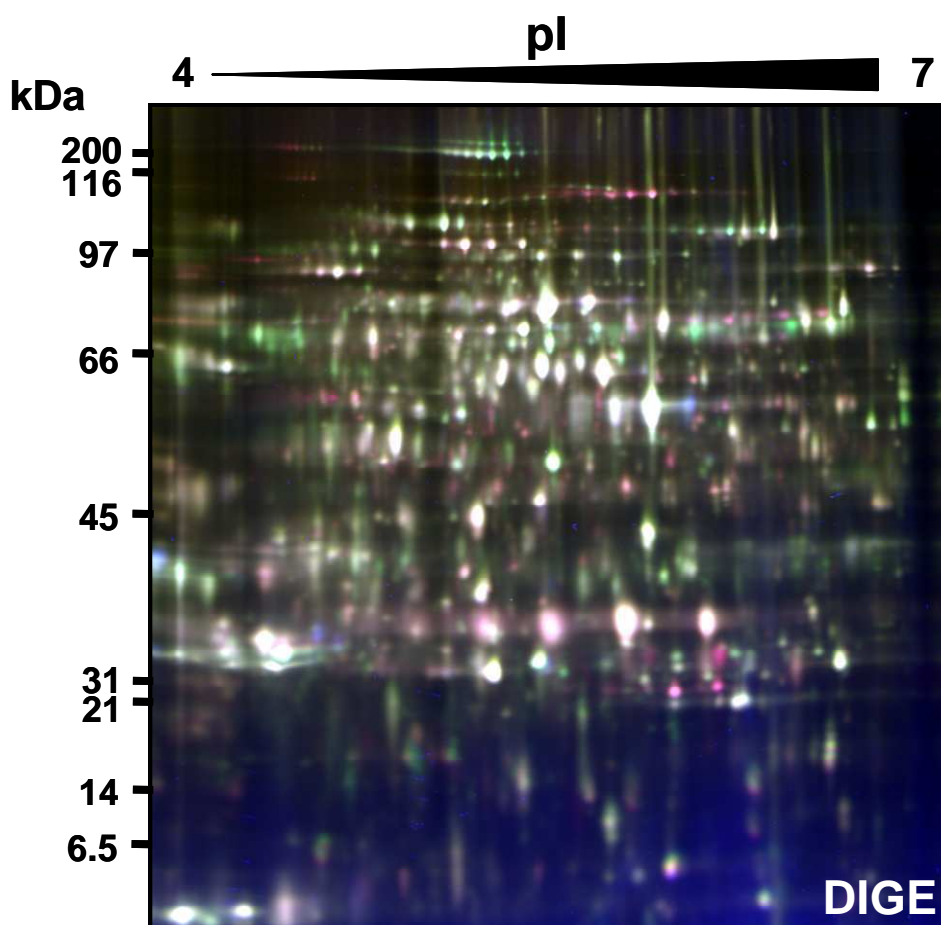
**Figure 54 : Cinétique d'extraits protéiques protoplastique en condition de stress oxydant ou cadmium sur électrophorèse suivie de l'incorporation de soufre  $^{35}$  :** des aliquotes des échantillons sont déposées sur gel à chaque point de la cinétique en respectant l'ordre suivant, le contrôle (0), le stress oxydant ( $H_2O_2$ ) et le stress cadmium (Cd). La photographie A correspond au gel d'électrophorèse coloré au bleu de Coomassie et la B à l'autoradiographie.

Ces tests n'ont pas permis de mettre en évidence des différences significatives entre les échantillons contrôle et stressés. La réalisation d'IEF / SDS PAGE 2D comparative du protéome vacuolaire contrôle *versus* stress cadmium en présence de  $S^{35}$  implique la préparation de dizaines de préparations de vacuoles en présence de radioactivité et d'un élément toxique, le cadmium. Si des différences sont observées, les spots 2D étant radioactifs ne pourront pas être analysés par spectrométrie de masse pour des raisons de sécurité. Cette approche a donc été abandonnée au profit d'approches moins contraignantes au point de vue technique.

### I.1.2 - Électrophorèse 2D différentielle DIGE

Une expérience d'électrophorèse 2D-DIGE (*2-Dimensional Differential in-Gel Electrophoresis*) a été réalisée en collaboration avec la Plateforme de protéomique de Marseille. À la différence d'un 2-DE classique la technique de DIGE permet de faire co-migrer sur un même gel deux extraits protéiques marqués par des sondes fluorescentes (Unlu, Morgan & Minden, 1997). Il existe 3 sondes fluorescentes : les CyDyes, de même masse et même charge, elles se lient au niveau des lysines avec la même affinité. D'un point de vue pratique, l'électrophorèse 2D-DIGE consiste à prémarquer les extraits protéiques ainsi que le standard interne (constitué d'un mélange d'une quantité égale en protéine de chaque échantillon) avec

les 3 CyDyes. Ensuite, les protéines sont séparées par électrophorèse bidimensionnelle. Le standard interne marqué avec la troisième sonde va permettre une normalisation des données et une analyse statistique rigoureuse (Timms & Cramer, 2008). Ce procédé permet de faire des comparaisons intra-gel et inter-gels fiables et améliore grandement la reproductibilité qui fait souvent défaut aux techniques classiques sur gels. Les CyDyes sont spectralement discernables, après avoir scanné les gels, un logiciel (DeCyder) va repérer les spots qui présentent une différence de fluorescence entre les deux échantillons. Ces spots seront découpés et les protéines qu'ils contiennent identifiées par spectrométrie de masse. L'électrophorèse 2D-DIGE offre donc la possibilité d'étudier les variations d'abondances relatives de chaque protéine, sur des centaines de protéines simultanément. Pour réaliser ces analyses DIGE, trois lots de chaque condition (contrôle ou stress cadmium) contenant de 4 à 6 préparations de vacuoles purifiées ont été nécessaires, soit plus de 30 préparations. Sur les 3 gels obtenus présentant un profil semblable de répartition des spots protéiques, un seul, de meilleure résolution, a été scanné par l'utilisation d'un densitomètre (Figure 55).



**Figure 55 : Cartographie de la dynamique du protéome soluble vacuolaire lors d'un stress causé par le cadmium.** Ce gel d'électrophorèse bidimensionnelle différentielle (DIGE) présente une échelle des pI indiquée au dessus allant de 4 à 7 et une échelle des poids moléculaires en kDa sur la gauche.

Ces expériences ont révélé que 22 spots présentaient des différences de densité significatives au regard d'un t-test et de la moyenne des ratios des abondances des protéines ( $>1,2$ ). Parmi celles-ci sont distinguées 7 protéines dont le ratio est strictement supérieur à deux ( $>2$ ). Cinq de ces sept protéines sont moins abondantes dans la condition stress et seulement deux se révèlent être plus abondantes lors du stress généré par le cadmium. Cette expérience n'a malheureusement pas pu être analysée par spectrométrie de masse. J'ai tout de même essayé de comparer le gel de DIGE au gel de 2-DE classique. L'échelle de pH du 2-DE s'étale de 3 à 6,75, celle de DIGE étant légèrement décalée, les pH s'échelonnent de 4 à 7. De plus les colorations diffèrent, du bleu de Coomassie a été utilisé pour le 2-DE classique et de l'argent pour la DIGE. Par une superposition graphique des 2 gels en tenant compte d'un réajustement des échelles de pH, cinq spot seraient identifiables. Ainsi ces expériences de DIGE révèlent cinq protéines différentiellement exprimées lors d'un stress cadmium qui sembleraient être une glycosidase, la Per 17 glycosidase, la VHA-B, une Serine Carboxypeptidase et une GST. Ces résultats n'étant que peu informatifs nous avons alors choisi de nous tourner vers une approche qui permet de visualiser les protéines synthétisées *de novo* lors d'un stress cadmium. J'ai utilisé une stratégie de protéomique quantitative basée sur le marquage des protéines par un isotope stable. Alors que les méthodes de gels 2D sont réservées à l'étude des protéines solubles, peu modifiées et dans des gammes de pH acide, les méthodes de protéomique avec marquage présentent l'avantage majeur de pouvoir s'appliquer aux protéines solubles comme aux protéines membranaires. Nous souhaitons ainsi étudier à la fois les protéines des sucres vacuolaires et celles du tonoplaste.

## **I.2 - Quantification par marquage métabolique**

L'émergence de nouvelles technologies a toujours suscité l'intérêt de par la possibilité qu'elles offrent d'obtenir de nouvelles informations. Les récentes techniques de marquage chimique (ICAT, iTRAQ) ou métabolique par des isotopes stables (SILAC,  $^{15}\text{N}$ ) associées à la MS ont permis aux chercheurs de se débarrasser des limites qui les empêchaient d'étendre leurs études à un grand nombre de protéines simultanément. L'intérêt majeur de ces approches est la comparaison de deux ou plusieurs protéome(s) quelque soit la nature des protéines qui les compose.

Les capacités de quantification relative ou absolue reposent sur la nécessité d'un référent pour déterminer la stœchiométrie des protéines. Le procédé le plus commun est d'utiliser un standard interne en réalisant un marquage chimique (ICAT, iTRAQ), les peptides des différents



échantillons sont étiquetés et tracés. Dans le cas d'un marquage métabolique par des isotopes stables (SILAC,  $^{15}\text{N}$ ), deux échantillons (provenant de deux situations biologiques différentes) peuvent être mélangés dès le début du processus et distingués à la fin. Généralement, l'introduction d'isotopes stables n'a pas d'incidence sur les propriétés physico-chimiques d'une protéine. Et par conséquent, aucune distinction n'est faite pendant le processus de croissance cellulaire, d'extraction et de séparation des protéines, de digestion protéolytique, et lors de la fragmentation des peptides lourds et légers de la même protéine. Ce n'est qu'à la dernière étape du processus, l'analyse par spectrométrie de masse, qu'une distinction peut être faite entre les versions lourdes et légères d'un même peptide par l'incrément de masse obtenu par l'incorporation des isotopes  $^{13}\text{C}$  /  $^{15}\text{N}$ . La quantification se fait par une comparaison des différences d'intensité de l'aire des pics des chromatogrammes d'ions.

#### **I.2.1 - La méthode SILAC (*Stable Isotope Labeling with Amino acids in Cell culture*)**

L'équipe a essayé la méthode SILAC. Cette méthode est largement utilisée chez les animaux et à fait ses preuves (Ong *et al.*, 2002 ; Ong et Mann, 2006 ; Emadali and Gallagher, 2009 ; Walther and Mann, 2011).

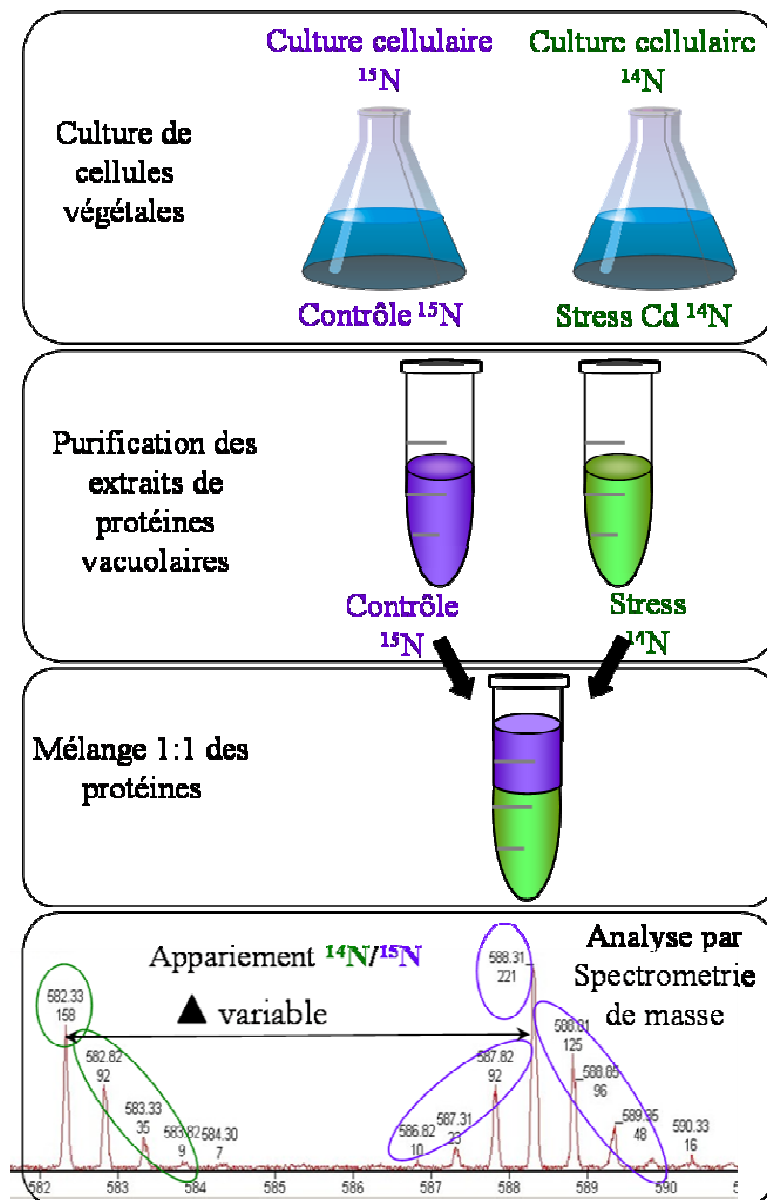
Chez les plantes, une étude SILAC de cellules d'*Arabidopsis thaliana* (Gruhler *et al.*, 2005) a été décrite avec une incorporation en acide aminé marqué de 80%. Nous avons donc choisi de suivre ce modèle expérimental et de l'appliquer à un stress cadmium. Mais l'incorporation des acides aminés marqués (K et R) s'est révélée incomplète et limitée.

La lignée cellulaire d'intérêt doit être auxotrophes pour obtenir une incorporation stable de l'acide aminé marqué utilisé. Puisque les plantes sont des organismes autotrophes, cette exigence fondamentale est un sérieux obstacle à une large application de la méthode SILAC chez les plantes (Thelen et Peck, 2007; Gouw *et al.*, 2010; Schulze et Usadel, 2010). Dans le cas de notre modèle biologique (*Arabidopsis thaliana*), les lysines et arginines marquées sont recyclées *via* le métabolisme des acides aminés, entraînant un marquage multiple des acides aminés irrégulier et inexploitable par les logiciels d'extraction des données. Nous avons donc abandonné cette méthode et opté pour un marquage des protéines par un isotope stable, l'azote ( $^{15}\text{N}$ ) sur l'ensemble des acides aminés.

## I.2.2 - La méthode $^{15}\text{N}$ : marquage métabolique par l'isotope 15 de l'azote

### I.2.2.1 - Le principe

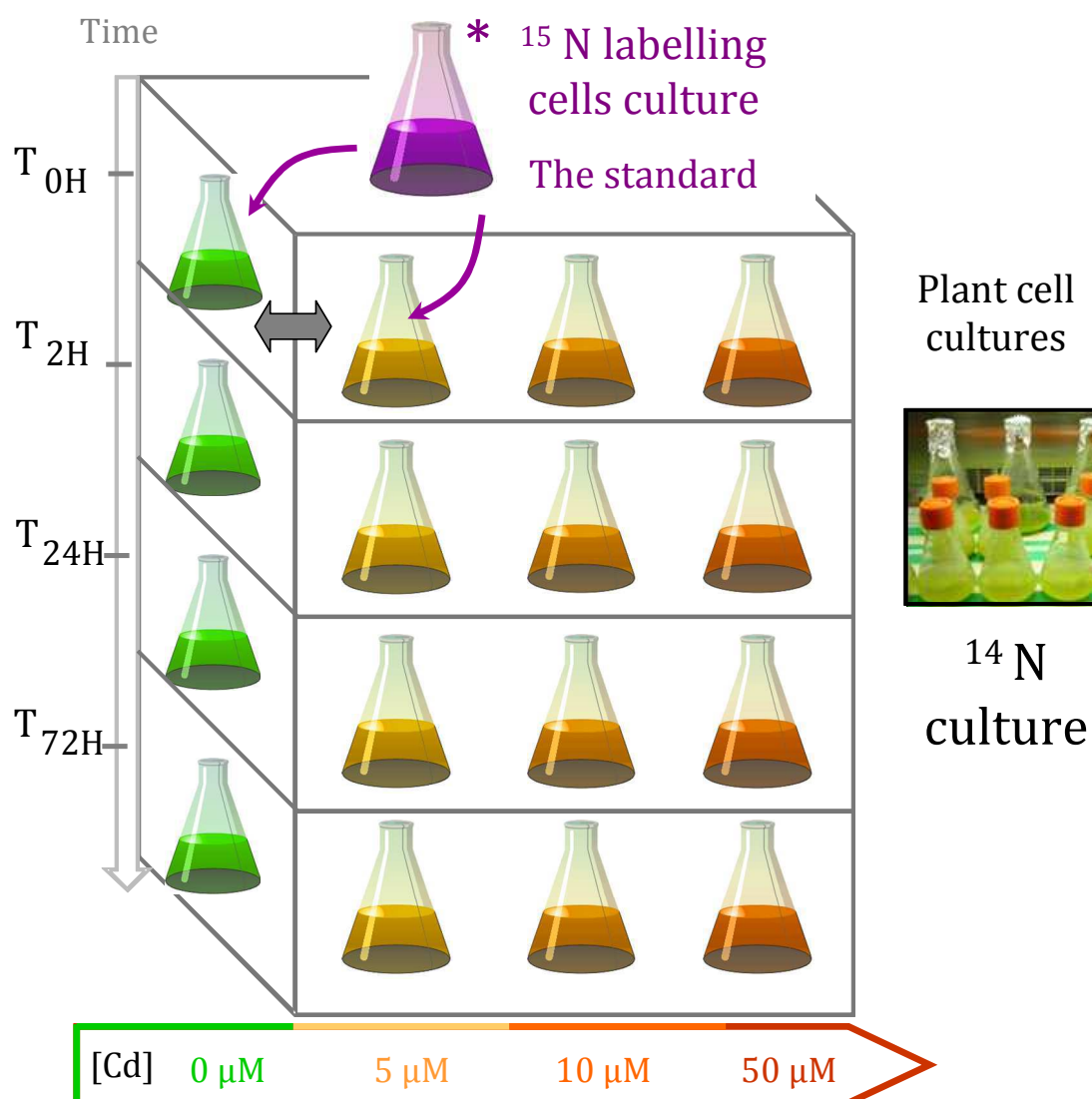
Cette approche permet de différencier deux populations cellulaires que l'on souhaite comparer. La première population est cultivée dans un milieu où les apports azotés (ammonium  $\text{NH}_4^+$  et nitrate  $\text{NO}_3^-$ ) comportent uniquement l'isotope d'azote « lourd » ( $^{15}\text{N}$ ). L'ammonium et le nitrate « lourds » sont assimilés par les cellules et métabolisés. Le  $^{15}\text{N}$  va progressivement constituer la structure des protéines au cours des repiquages successifs des cellules. Toutes les protéines cellulaires sont alors marquées sur l'ensemble de leurs résidus azotés. On obtient ainsi **une population de cellules marquées  $^{15}\text{N}$** . La seconde population cellulaire est cultivée en milieu classique avec de l'azote sous sa forme isotopique d'abondance naturelle le  $^{14}\text{N}$ . L'une ou l'autre de ces populations est soumise au stress cadmium. Les extraits protéiques des cultures sont préparés, **mélangés en proportions équivalentes**, puis soumis à une digestion tryptique afin d'être analysés par spectrométrie de masse. Les peptides tryptiques  $^{14}\text{N}$  et  $^{15}\text{N}$ , obtenus à partir de la digestion du mélange de ces extraits protéiques sont différenciés par l'incrément de masse dû à l'incorporation d'azote 15. Il est alors possible d'identifier les protéines dont la néosynthèse se trouve induite lors du stress et de quantifier leurs proportions relatives entre les 2 échantillons (Figure 56).



**Figure 56 : Méthodologie résumée du processus  $^{15}\text{N}$  :** Le  $^{15}\text{N}$  « lourd » est ajouté dans le milieu de culture des cellules, puis assimilé par celle-ci, ce qui permet de marquer les protéines (en violet). Une autre culture, non marquée, est menée en parallèle (en vert). L'une ou l'autre de ces cultures est soumise au stress étudié. Les extraits protéiques des vacuoles sont préparés, mélangés en proportions égales, puis soumis à une digestion trypsique pour être ensuite analysés en spectrométrie de masse. Les peptides de séquences identiques de chaque culture cellulaire sont différenciés par le delta de masse  $^{14}\text{N} / ^{15}\text{N}$ . En comparant les abondances respectives, il est alors possible de mettre en évidence les protéines répondant au stress appliqué et de quantifier leur proportion relative.

## I.2.2.2 - Notre stratégie

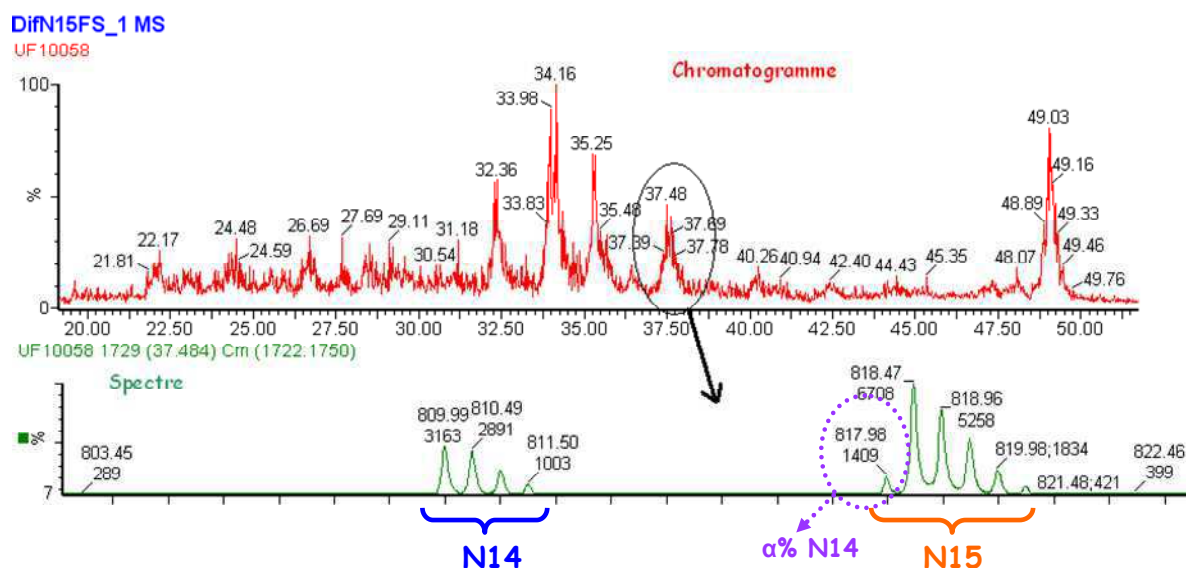
Classiquement à travers la littérature on retrouve de nombreuses références qui utilisent un marquage croisé lors d'expérience de marquage métabolique par de l'azote  $^{15}\text{N}$  (Krijgsveld *et al.*, 2003 ; Tops *et al.*, 2010). Nous avons choisi de ne pas réaliser de marquage croisé mais d'utiliser l'échantillon ayant poussé sur un milieu  $^{15}\text{N}$  en condition optimale de croissance comme référence. Cet échantillon  $^{15}\text{N}$  est donc incorporé en proportion équivalente aux différents échantillons que l'on souhaite comparer (Figure 57). Cette stratégie doit nous permettre de réaliser une cinétique à différentes concentrations de cadmium soit différents niveaux de stress métallique au cours du temps et de minimaliser le nombre d'expérience à reproduire.



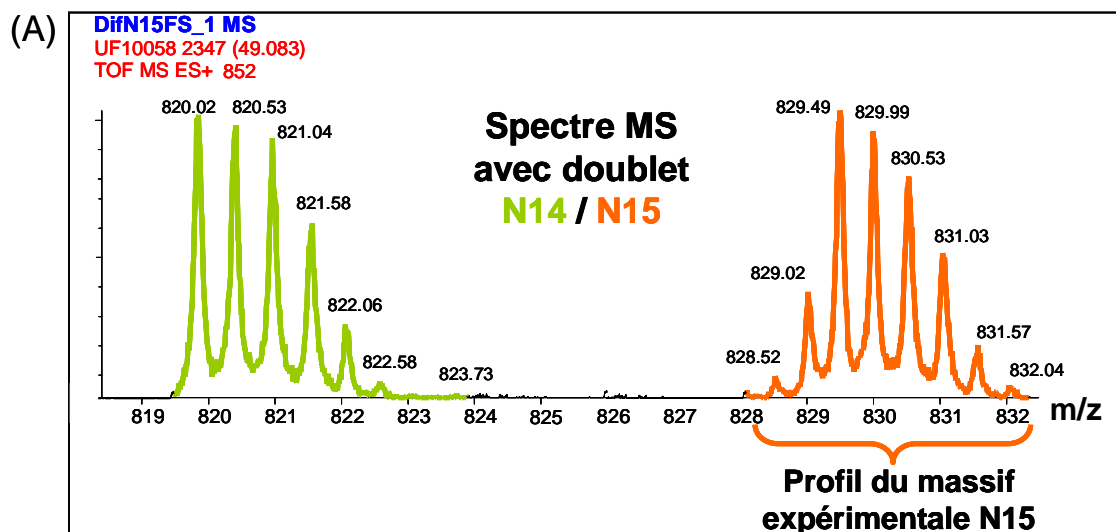
**Figure 57 : Design expérimental de la stratégie d'analyse  $^{15}\text{N}$  :** La culture  $^{15}\text{N}$  en violet correspond à l'échantillon standard qui est ajouté comme référent en quantité connu dans les autres échantillons. Les fioles vertes correspondent aux contrôles et les fioles orangées aux différents niveaux de stress métallique. Sur l'axe des ordonnées est indiqué l'échelle de temps et en abscisse l'échelle de concentration en sel de cadmium.

### I.2.2.3 - L'estimation du pourcentage d'incorporation

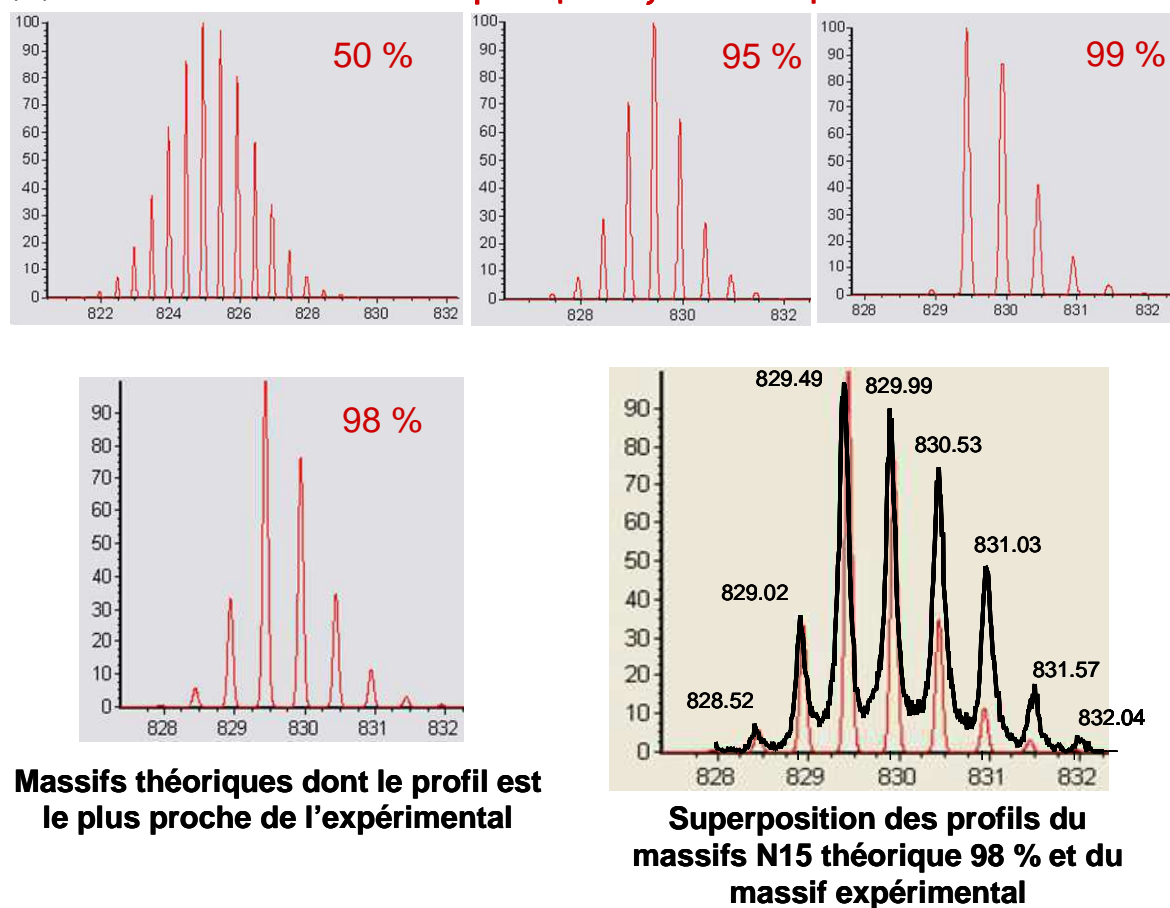
On peut évaluer qu'après 6 à 8 générations de cellules en culture le renouvellement cellulaire conduit à un marquage azoté des protéines entre 90 et 99,9 %. Afin d'optimiser l'analyse des données et les résultats de quantification, dans un premier temps, nous avons estimé le taux d'incorporation d'azote. L'estimation du pourcentage d'incorporation peut-être réalisée par une visualisation des massifs (Figure 58). En réalisant une superposition des massifs théoriques dont les pourcentages d'incorporation sont connus avec les massifs expérimentaux on peut obtenir une première estimation (Figure 59). Le pourcentage d'incorporation est ainsi estimé à 98% de marquage.



**Figure 58 : Chromatogramme et spectre de masse typique d'analyse  $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$  :** En rouge est représenté le chromatogramme correspondant à l'analyse en QTOF des protéines vacuolaires solubles. Au temps 37,48 minutes, le spectre est extrait et représenté en vert en dessous. Les accolades soulignent le doublet de massifs  $^{14}\text{N}$  (bleu) et  $^{15}\text{N}$  (orange). La proportion d'azote non incorporé est visible sur le massif  $^{15}\text{N}$  par la présence d'un pic correspondant à un pourcentage alpha de  $^{14}\text{N}$  symbolisé en violet.



(B) **Profil de massifs théoriques pour  $\zeta$  % d'incorporation d'azote 15**

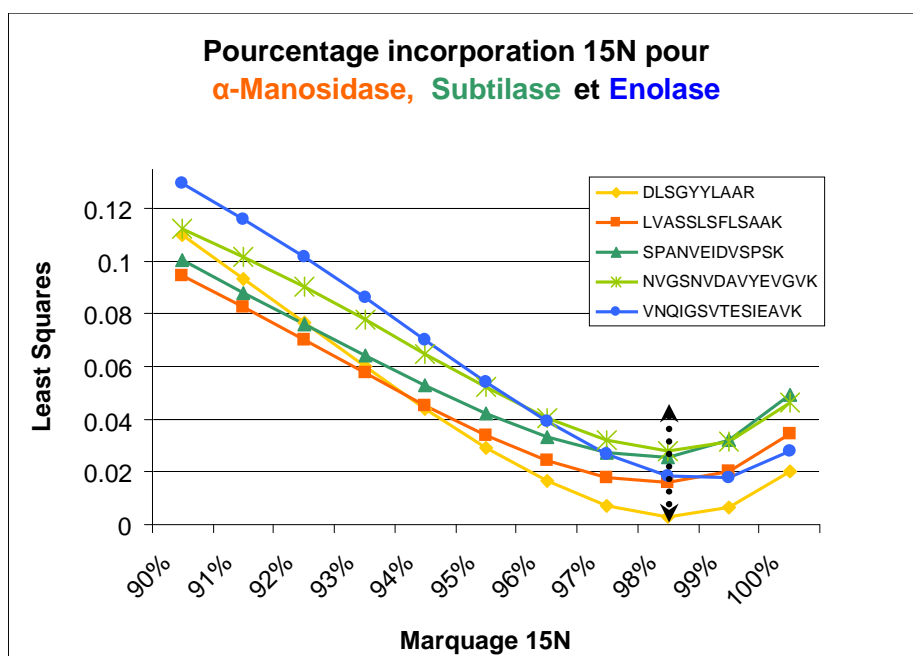


**Figure 59: Profils des massifs  $^{15}\text{N}$  théoriques pour le peptide ISFLGTLIGSPSPSPR avec son massif expérimental extrait depuis MassLynx® :** (A) Spectre MS du doublet  $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$  du peptide ISFLGTLIGSPSPSPR, le massif  $^{14}\text{N}$  est en vert et le massif  $^{15}\text{N}$  en orange. (B) Représentation graphique des massifs  $^{15}\text{N}$  théorique à différent pourcentage d'incorporation (50 % ; 95 % ; 98 % et 99 %) et superposition du massif  $^{15}\text{N}$  théorique 98 % avec le massif expérimental.

Afin d'estimer de façon précise le pourcentage d'incorporation en azote 15, j'ai utilisé la méthode statistique de régression par les moindres carrés (Snijders et al., 2004). La méthode des moindres carrés permet de comparer des données expérimentales, généralement entachées d'erreurs de mesure, à un modèle mathématique censé décrire ces données. Pour quelques protéines majoritaires identifiées, j'ai choisi 3 à 5 peptides. Lors de la première étape, le logiciel IsoPro® permet de calculer les distributions massiques pour différents pourcentages d'incorporation de l'isotope 15 d'azote. En faisant varier ce pourcentage de 90 à 100 % avec un pas de un point entre chaque mesure, on obtient pour chaque peptide choisi une matrice de valeurs de distribution massique. La deuxième étape nécessite de relever les valeurs de distribution massique et d'abondance relative à chaque pic des massifs  $^{15}\text{N}$  expérimentaux depuis MassLynx®. La différence des moindres carrés est alors calculée entre les abondances normalisées théoriques et expérimentales pour chaque peptide.

$$X^2 = (A_N \text{ théorique} - A_N \text{ expérimental})$$

La méthode des moindres carrés révèle que nos données présentent un pourcentage d'incorporation de 98,5% (Figure 60).



**Figure 60 : Représentation graphique des valeurs de  $\chi^2$  pour 5 peptides différents.** Les deux premiers peptides de la légende (courbe jaune DLSGYylaAR et orange LVASSLSFLSAAK) correspondent à l' $\alpha$ -manosidase. Les deux peptides en vert (SPANVEIDVSPSK et NVGSNVDAVYEVGVK) appartiennent à la subtilase et le peptide en bleu (VNQIGSVTESIEAVK) à l'énolase.



### I.2.2.4 - Le traitement informatisé des données de quantification en vue de leur exploitation

Les techniques de marquage cellulaire étant parfaitement contrôlées, le facteur limitant de l'utilisation de cette approche a longtemps demeuré le traitement et l'analyse bioinformatique des données.

#### a) L'identification des données dans Mascot®

Au début de ma thèse, je traitais les données de quantification, soit les fichiers MS, indépendamment des données d'identification, soit les fichiers MS/MS. Dans un premier temps chaque fichier MS/MS brut en sortie du spectromètre de masse (QTOF) était traité deux fois dans mascot®. Une première fois dans mascot® version classique pour traiter les données  $^{14}\text{N}$  et identifier les protéines présentes puis une seconde fois dans une version de mascot® adaptée aux données  $^{15}\text{N}$  afin d'identifier les protéines ayant incorporé le  $^{15}\text{N}$ . Je devais ensuite recouper les informations d'identification  $^{14}\text{N}$  /  $^{15}\text{N}$  (Figure 61).

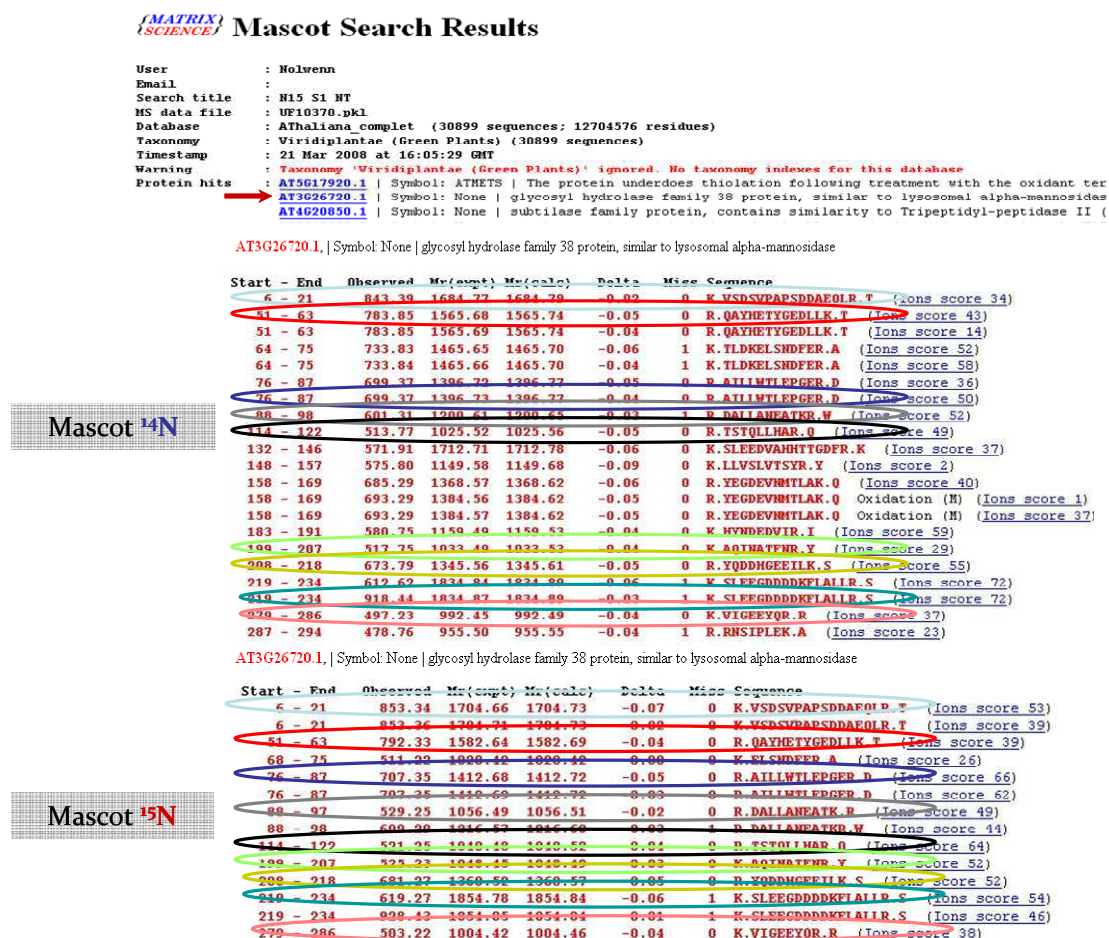


Figure 61 : Identification  $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$  de l'alpha-mannosidase dans une bande de gel 1D. Les peptides sont identifiés sous leurs deux formes dans les deux versions de Mascot et assemblés 2 à 2 (symbolisé par les cercles de couleurs).



Il fallait ensuite traiter les données de quantification (MS). Dans une première approche j'ai tenté d'exploiter les données via des logiciels développés en interne, à la base pour des approches SILAC, le binôme RMI et MIME.

*b) RMI et MIME*

RMI & MIME sont des outils complémentaires d'analyse de la trace MS développés au laboratoire EDyP par l'équipe informatique.

RMI pour Recherche de Massifs Isotopiques est basé sur la correspondance d'un modèle théorique de massifs isotopiques avec les données expérimentales. La distribution isotopique attendue est calculée en fonction de la masse supposée du peptide. Ce calcul est basé sur un acide aminé (AA) moyen dont la composition atomique correspond à la composition moyenne des AA naturels, compte tenu de leur fréquence d'apparition dans les banques de données protéiques. Il est nécessaire de fournir à RMI un pourcentage d'incorporation d'azote afin qu'il repère les massifs  $^{15}\text{N}$ .

MIME pour Marquage isotopique et mesure d'expression permet l'appariement des paires de massifs  $^{14}\text{N}$  /  $^{15}\text{N}$  et la quantification des massifs par une mesure de l'aire du pic de l'intensité de chaque massif. Il est nécessaire de fournir au logiciel une indication du décalage de masse (+1, +2, ... +9) entre un massif isotopique d'abondance naturelle et un massif isotopique marqué pour qu'il réalise les appariements.

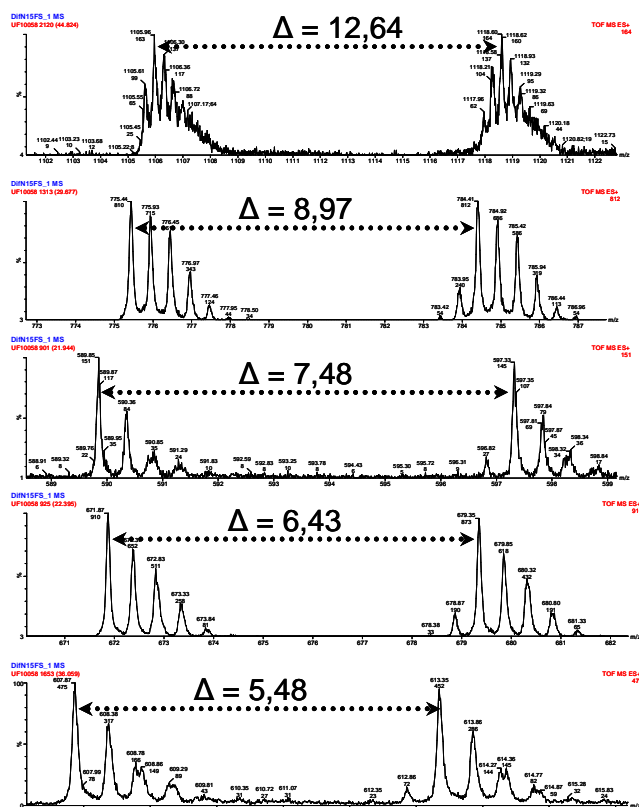
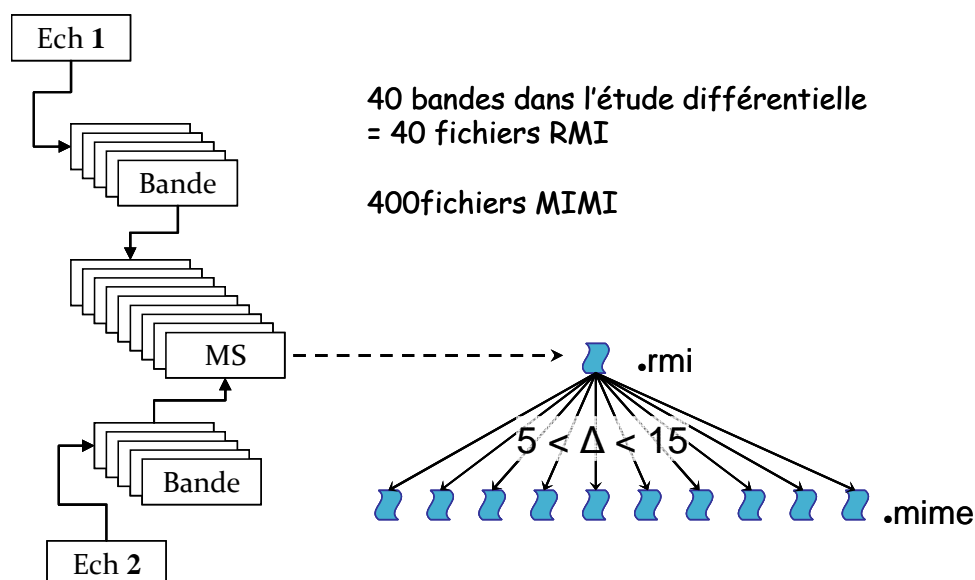


Figure 62 : Exemple de delta de masse entre les paires de massifs isotopique  $^{14}\text{N} / ^{15}\text{N}$ .

Le delta de masse entre les paires de massifs  $^{14}\text{N} / ^{15}\text{N}$  est variable puisqu'il dépend de la proportion d'azote selon la composition en acides aminés de chaque peptide (Figure 62). Les logiciels RMI et MIME ont été *primo* développés pour s'atteler aux données SILAC qui présentent une distance entre les doublets fixes. RMI repère les massifs puis MIME réunit les paires en appliquant une mesure de différence de masse de +8 Da ou +10 Da entre les peptides lourd et léger selon la procédure standard SILAC. Afin d'obtenir le plus d'appariement possible  $^{14}\text{N} / ^{15}\text{N}$  à l'aide du logiciel MIME une fonctionnalité a été ajoutée et permet de préciser la valeur de delta que l'algorithme prend en compte. Le delta de masse entre les paires de massifs  $^{14}\text{N} / ^{15}\text{N}$  étant variable chaque recherche issue de RMI (.rmi) est processée dans MIME pour une gamme de delta de masse de 5 à 15 Da (Figure 63).



**Figure 63 : Schéma du pipeline RMI / MIME.** Exemple de deux échantillons biologiques déposés sur gel donnant respectivement 5 bandes électrophorétiques. Chaque bande est analysée en MS puis chaque spectre MS est analysée dans RMI. Chaque fichier .rmi est traité 11 fois dans MIME pour réaliser les appariements. Pour 40 bandes électrophorétiques de l'étude différentielle, on obtient ainsi 400 fichiers .mime.

Les fichiers de quantification issus de RMI et MIME (.rmi et .mime) étaient convertibles au format xls. J'ai tenté de réaliser un recoupement manuel des données sous excel, qui est incontestablement devenu ingérable. L'appariement en vue de la quantification étant difficile à réaliser avec ces deux logiciels, ils se sont avérés inadaptés pour la méthode  $^{15}\text{N}$ .

J'ai ensuite tenté d'exploiter les données via des logiciels open source du PNL (Pacific National Laboratory) [Viper and Decon2LS].

### c) *Viper et DEcon2LS*

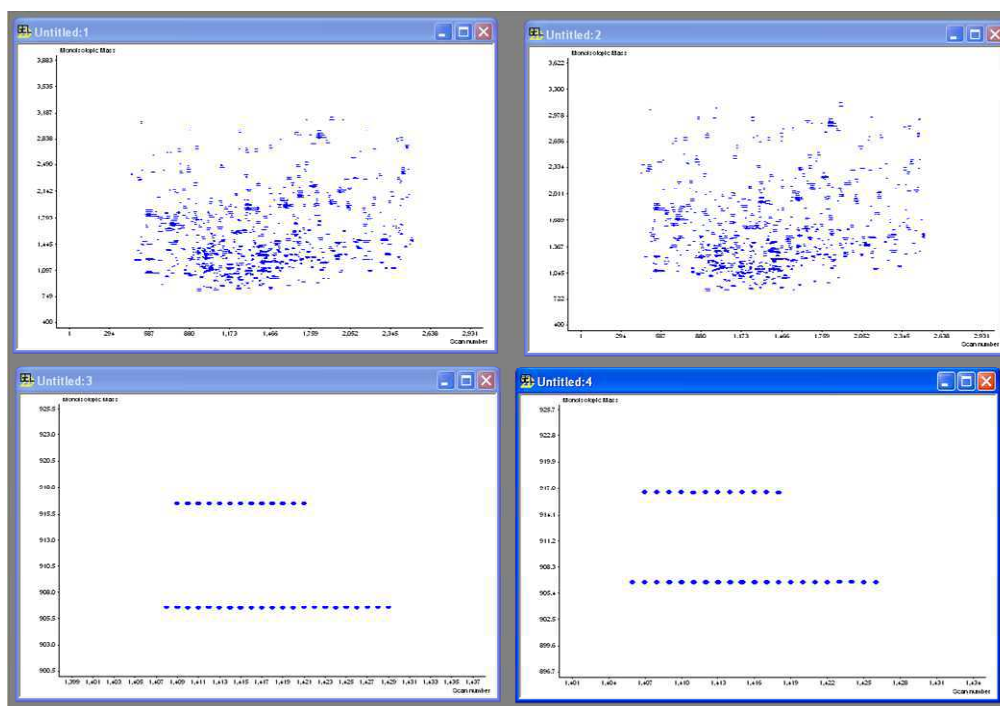
Viper & Decon2LS sont des outils complémentaires d'analyse et de quantification de la trace MS qui se téléchargent gratuitement depuis le site du PNNL. Ils sont principalement destinés aux traitements des données d'instruments de masse à haute précision de mesure (par exemple, FT-ICR ou Orbitrap) (Figure 64).

Decon2LS est un logiciel utilisé pour la détection des données MS, le principe de base est la déconvolution des massifs isotopiques. Cet outil détecte tous les massifs isotopiques présents puis les ordonne en définissant le début du massif par le pic le plus intense, enfin il réalise une auto-corrélation entre les massifs  $^{14}\text{N}$  /  $^{15}\text{N}$ . Au cours du processus, on peut distinguer

différentes étapes de réduction du bruit de fond, détection de crête, prédiction du massif isotopique théorique et une fonction qui quantifie la qualité de la signature observée.

VIPER (*Visual Inspection of Peak / Elution Relationships*) peut être utilisé pour visualiser et caractériser les éléments détectés par Decon2LS en analyses LC-MS.

Light MW	Light Charge Basis MZ	Light Abu	Light ScanStart	Light ScanEnd	Light Charge State Basis	Delta Count	Heavy MW	Heavy Charge Basis MZ	Heavy Abu	Heavy ScanStart	Heavy ScanEnd	Heavy Charge State Basis	ER	N15 Incorporation %	
906.5138	454.26418	2358	1406	1426	2	11	916.48995	459.25225	716	1407	1418	2	3.293296	93	0.9931065
906.5313	454.27293	2381	1408	1429	2	11	916.5085	459.26153	718	1409	1421	2	3.316156	93	



**Figure 64 : Visualisation VIPER des paires :** (A) ligne de tableau excel pour un doublet  $^{14}\text{N} / ^{15}\text{N}$  extrait depuis decon2LS dont le ratio est de 1. (B) visualisation de ce doublet dans un échantillon référent à gauche ( $^{14}\text{N}$  contrôle /  $^{15}\text{N}$  standard) et un échantillon stress à droite ( $^{14}\text{N}$  stress cadmium /  $^{15}\text{N}$  standard) montrant aucune variation entre les deux échantillons.

Le pipeline défini avec l'utilisation de Viper et Decon2LS est découpé selon deux axes (Figure 65)

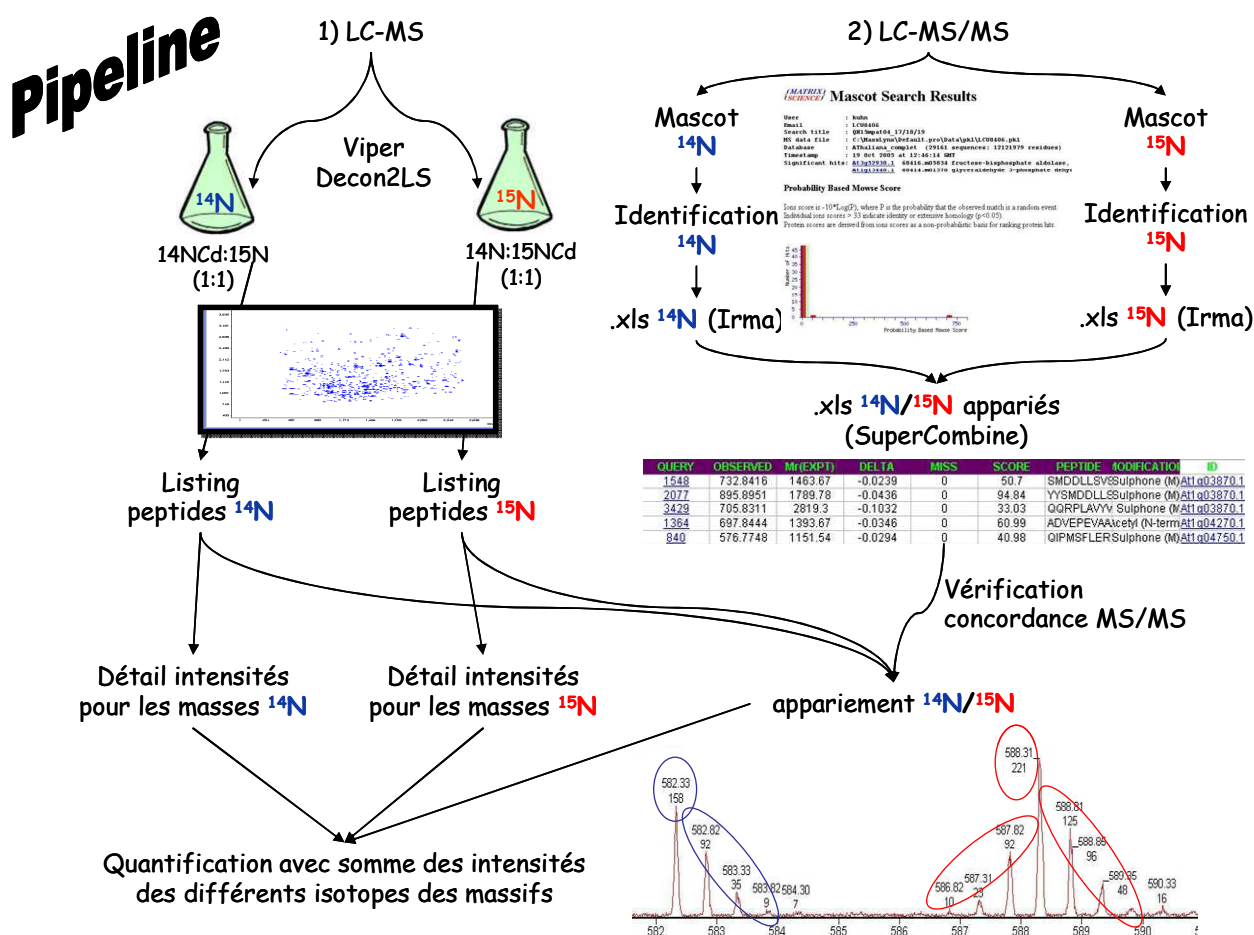


Figure 65 : Pipeline d'analyse  $^{14}\text{N}$  /  $^{15}\text{N}$  mis en place avec l'utilisation des logiciels Viper & Decon2LS. À droite 1) le protocole de quantification et à gauche 2) le protocole d'identification des protéines.

Ces logiciels développés pour les approches de types label free AMT permettent une étude de la trace MS très efficace mais pas le recoupement automatique des données MS et MS/MS. L'association des données MS et MS/MS à l'aide de tableurs étant laborieuse, une autre solution a été envisagée.

#### d) MFPAq

Dans un troisième temps j'ai testé un logiciel développé par la plate-forme de protéomique de Toulouse, appelé MFPAq. La stratégie de validation des données dans MFPAq est basée sur la validation des peptides unité par unité. La validation des données avec le logiciel de validation iRMA utilisé à EDyP est basée sur le regroupement des peptides au sein d'un groupe de protéines (*protein group - master*). La stratégie de validation dans MFPAq n'étant pas en correspondance avec les données d'identification acquise via l'utilisation d'iRMA, cette option a été abandonnée.

*e) Mascot Distiller*

Une solution commerciale a finalement dû être envisagée. Mon investissement dans le groupe de travail constitué au laboratoire EDyP pour l'exploitation des données N15 a conduit à la mise en place d'un pipeline d'analyse des données reposant sur le déploiement et l'optimisation d'une suite logiciel « Mascot distiller® » associé à un module de quantification. L'utilisation de cette suite d'outils permet non seulement de s'affranchir des problèmes de compatibilité avec notre pipeline d'analyse (IRMa, hEIDI) mais aussi de combiner les résultats d'identification avec les résultats de quantification en un seul fichier. Les problèmes d'exploitation de ces données d'étude globale qui étaient en attente de développements informatiques sont enfin en passe d'être résolus. Ainsi équipé, le laboratoire est maintenant en mesure d'exploiter les données générées dans le cadre de ces approches, ce va qui permettre de traiter les données générées et d'identifier les protéines différentiellement exprimées suite à un stress cadmium.

**I.2.2.5 - Exploitation et résultats**

Les données issues des expériences <sup>14</sup> N / <sup>15</sup> N ont été analysées à l'aide de Mascot Distiller, validées via IRMa et basculées dans la base de donnée vacuoles. La première analyse (non statistique) des données de la condition 2 h de stress cadmium à 50 µM semble indiquer qu'aucune protéine ne présente de différences significatives de leur taux d'expression entre les conditions contrôle et stress cadmium. La mise au point d'un pipeline d'analyse statistique des données de quantification avec marquage est en cours au laboratoire. Ce pipeline va être implémenté au sein du logiciel hEIDI (qui nous permet d'exploiter les informations contenues dans les bases de données protéomiques) sous forme d'un module de quantification et d'analyse statistique des données. Cette analyse mathématique des données révélera peut-être de fine régulation du taux d'expression des protéines lors d'un stress cadmium sur un temps court de stress (2 h).

**I.2.3 - Conclusion sur les approches sans *a priori***

Le parcours suivi afin d'observer la dynamique du protéome vacuolaire lors d'un stress cadmium sans *a priori* fut riche en apprentissage technique mais moindre au niveau de son aboutissement scientifique. Pour contourner ces difficultés, nous avons choisi d'entamer une étude ciblée sur des protéines potentiellement impliquées dans la réponse au stress cadmium

par Selected Reaction Monitoring (SRM). Cette approche tient compte des études préliminaires et combine à la fois l'utilisation des échantillons N15/N14 et de protéines candidates. Les protéines candidates sont issues de la comparaison croisée des données quantitatives de transcriptomique de stress Cd (Herbette *et al.*, 2006) et des données de protéomique vacuolaire.

## **II - Recherche de protéines vacuolaires présentant une régulation transcriptionnelle par le cadmium**

L'un des aspects de la dynamique du protéome vacuolaire auquel nous avons souhaité nous intéresser est la régulation transcriptionnelle des gènes codant les protéines localisées à la vacuole. Des analyses d'expression génique réalisées au Laboratoire des Echanges Membranaires et Signalisation (CEA-Cadarache) en collaboration avec notre équipe à LPCV ont permis d'étudier l'influence d'un stress cadmium sur la régulation transcriptionnelle du génome d'*Arabidopsis thaliana* (Herbette *et al.*, 2006). Cette analyse rend compte de l'évolution des transcripts dans des plantules cultivées en hydroponie et soumises à 5  $\mu$ M et 50  $\mu$ M de cadmium pendant 2 h, 6 h et 30 h. Florent Villiers, le doctorant qui m'a précédé a initié l'exploitation croisée de ces résultats avec ceux de l'analyse protéomique vacuolaire (Jaquinod *et al.*, 2007). Les protéines mises en évidence pourraient être indispensables dans la détoxification vacuolaire des métaux lourds.

### **II.1 - L'approche transcriptomique**

#### **II.1.1 - La base de données d'expression génique**

La base de données relationnelle créée par Florent Villiers, en collaboration avec Olivier Bastien (LPCV, CEA-Grenoble), a été nommée ArHeS (*Arabidopsis Heavy metal Stress*), et contient deux tables : une table *microarray*, qui stocke les valeurs issues des analyses d'expression génique sur puce (Herbette *et al.*, 2006), et une autre table *proteomics*, qui accueille les résultats de l'analyse protéomique vacuolaire que nous avons réalisé (Jaquinod *et al.*, 2007). Cette base de données a été mise en place grâce à un « package » EasyPHP (v1.7) (thèse F. Villiers, 2008).

La table protéomique contient 709 entrées réunissant les données sur le tonoplaste publiée dans Jaquinod *et al.*, (2007) ainsi que les résultats d'identification des gels d'électrophorèse à deux dimensions. La table transcriptomique contient 23 797 entrées, et des champs correspondants aux résultats des différentes comparaisons (2 h d'exposition à 5  $\mu$ M Cd vs. contrôle à 2 h, 6 h d'exposition à 50  $\mu$ M Cd vs. contrôle à 6 h, etc ...). L'identifiant unique

de cette table est constitué du couple de champs *AGI* et d'un *Index*. L'AGI correspond au numéro d'accèsion AGI (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000) de chaque protéine. Un même locus pouvant être représenté par plusieurs sondes nucléiques sur la puce à ADN, un index (a, b, c ...) de la sonde permet donc de différencier des résultats provenant de sondes différentes pour un même gène. Les données ont été insérées dans la base grâce à un script PHP (*hypertext preprocessing*). L'interface graphique d'interrogation de la base et de présentation des résultats à l'écran est codée par des scripts HTML (*HyperText Markup Language*), interprétés par un navigateur internet (Microsoft Internet Explorer® ou Mozilla Firefox® par exemple) à la manière de pages web.

Cette base de données s'est révélée très utile dans l'exploitation des données de transcriptomique, en particulier pour la sélection des gènes dont les produits ont été identifiés dans la vacuole et dont l'expression est régulée par le stress cadmium (Figure 66).

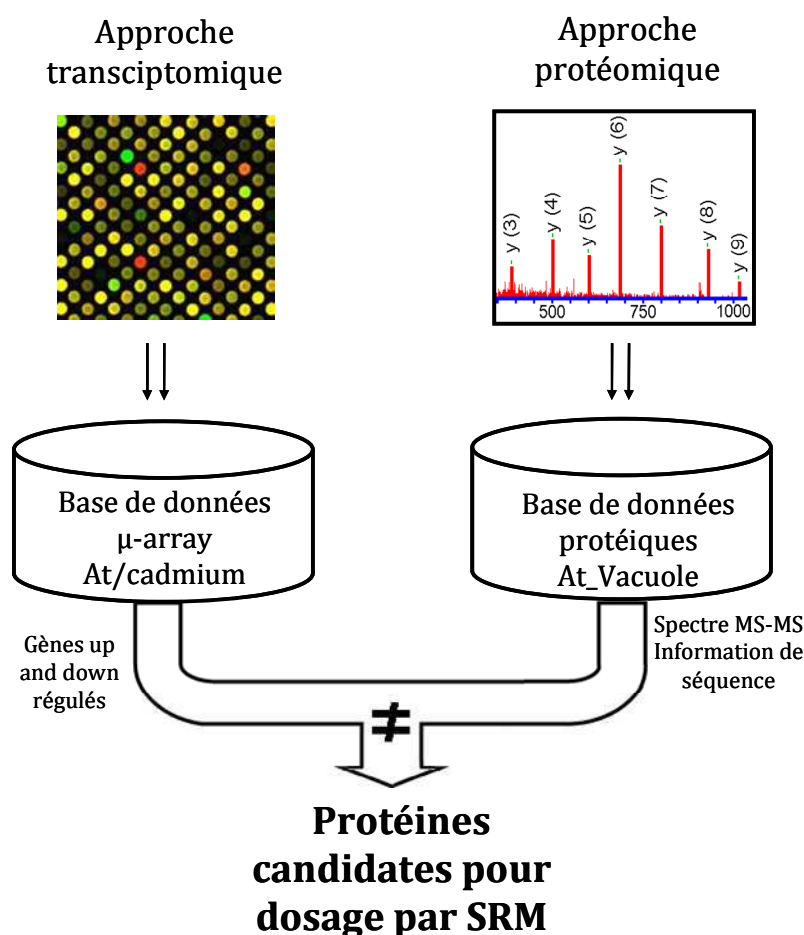


Figure 66 : Corrélation croisée des données de protéomique vacuolaire et de transcriptomique cadmium.



## II.1.2 - Croisement et appariement des données transcriptomiques et protéomiques

Afin d'optimiser la recherche de protéines vacuolaires dont les gènes présentent une régulation transcriptionnelle de leur expression, nous avons choisi d'utiliser l'ensemble des protéines vacuolaires identifiées chez *Arabidopsis thaliana* comme référence. Les identifications réalisées par les différents travaux de protéomique vacuolaire sont complémentaires, part leurs méthodologies de protéomique et la variété du matériel végétal à partir duquel ont été purifiées les vacuoles (intactes ou non). Les N° AGI de plus 1000 protéines différentes identifiées dans les travaux de Szponarski *et al.* (2004), Shimaoka *et al.* (2004), Carter *et al.* (2004) et Jaquinod *et al.* (2007) ont été utilisées pour constituer la base de référence du protéome vacuolaire. Sur 1011 gènes dont les protéines ont été identifiées dans la vacuole ou associées à cet organe par l'ensemble des études mentionnées, 851 sont présents sur la puce d'analyse CATMA (dans la table transcriptomique), et 709 loci sont présents dans la table protéomique (correspondant à 709 protéines identifiées). Dans un second temps, les gènes dont l'expression est régulée lors d'un stress cadmium ont été sélectionnés à partir de la table transcriptomique. Le résultat de l'analyse croisée des protéines vacuolaires présentes dans la table transcriptomique (Figure 67-A) et des gènes induits par le cadmium (Figure 67-B) a débouché à l'établissement de la liste de 250 gènes codant des protéines vacuolaires dont le niveau d'accumulation de transcript est modifié par un stress cadmium.

**Recherche de toutes les protéines ... (A)**

**Mot clé**

Tous les champs :

**Caractéristiques de la protéine**

MW : compris entre  kDa et  kDa

PI : compris entre  kDa et  kDa

Présence de domaine(s) transmembranaire(s) (TMD) : ☐

**Identifications MS**

☒ Fraction membranaire ☒ Identif en gel Score >=  0

☒ Identif en solution Score >=  0

☒ Fraction soluble -- Identif en gel Score >=  0

**Publications**

	Id.	Non Id.	S.I.
Szponarski <i>et al.</i>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>
Shimaoka <i>et al.</i>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>
Carter <i>et al.</i>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>

**Cinétiques SILAC / <sup>15</sup>N**

*Fonction en construction*

**Ajouter le bloc**

ET

Recherche de tous les gènes ...

**Type de valeur**

Valeur d'induction

**Temps**

☐ à 2 heures  
☐ entre 2 et 6 h  
☐ à 6 heures  
☐ entre 6 et 30 h  
☐ à 30 heures

**Concentration**

☐ Contrôle  
☐ à 5  $\mu\text{M}$   
☐ à 50  $\mu\text{M}$

**Opérateur du bloc**

et

**(B)**

**Site**

**Mot clé**

**Ajouter le bloc**

ET

**Figure 67 : Captures d'écran des interfaces d'interrogation des tables proteomics (A) et microarray (B) d'ArHeS.** Les requêtes SQL pour sélectionner des données de la base peuvent être générées à partir de formulaires. Une interface graphique, adaptée à la table que l'on souhaite interroger, permet de sélectionner les champs sur lesquels on souhaite effectuer la requête, et de spécifier la valeur souhaitée. Source : d'après la thèse de Florent Villiers (2008).

### II.1.3 - Protéines vacuolaires dont les gènes ont une régulation transcriptionnelle en présence de cadmium

Parmi les 250 protéines vacuolaires identifiées par spectrométrie de masse dont le niveau de transcript est modulé lors d'un stress cadmium. Trois peroxidases sont induites dans les feuilles et dans les racines, ainsi que d'autres protéines de la réponse au stress telles que 2 HSP (*Heat Shock Protein*), des glutathione S-transferases, ou bien encore une glutaredoxine et une glutathione réductase (Tableau VI). L'analyse croisée a également fait apparaître plusieurs processus intéressants impliquant la vacuole, notamment parmi la classe des transporteurs et des protéines de la signalisation cellulaire / régulation protéique.

**Tableau VI : Sélection de 52 protéines vacuolaires codées par des gènes dont le niveau d'accumulation de transcripts est régulé lors d'un stress cadmium.** L'analyse croisée des résultats de protéomique vacuolaire (travaux de Szponarski *et al.* (2004) (**Sz**), Shimaoka *et al.* (2004) (**Sh**), Carter *et al.* (2004) (**Ca**) et Jaquinod *et al.* (**Ja**)) avec les résultats d'analyses transcriptomiques effectuées par Herbette *et al.* (2006) ont permis de sélectionner 250 protéines vacuolaires dont l'expression génique est régulée par le cadmium. Le tableau présente une partie de ces protéines avec les rapports d'expression des gènes correspondants dans les feuilles et les racines après 2 h, 6 h et 30 h d'exposition à 5 et 50  $\mu\text{M}$  Cd. **Id** : index de la sonde nucléique de la puce CATMA. **Rouge** : induction, **Vert** : répression. (d'après Villiers 2008)

Locus	id	FEUILLES						RACINES						Fonction	Ja	Ca	Sh	Sz	
		5 μM Cd			50 μM Cd			5 μM Cd			50 μM Cd								
		2 h	6 h	30 h	2 h	6 h	30 h	2 h	6 h	30 h	2 h	6 h	30 h						
Transporteurs																			
At5g39040	a	1	1	1	1	1	1	1,57	1	1,73	1	1	4,23	ABC transporter (TAP2)	x	x	x		
At2g34660	a	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1,91	ABC transporter (MRP2)	x		x		
At2g47800	a	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2,04	ABC transporter (MRP4)	x	x	x	x	
At1g04120	a	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	ABC transporter (MRP5)	x				
At3g13090	a	1	1	1	1	1	1	1	1	1,96	1	1	4,08	ABC transporter (MRP6)	x				
At1g61890	a	2,2	1	1	1	1	1	3,34	1	1	1	1	1,75	2,08	MATE efflux family protein			x	
At1g71140	a	1	1	1	1	1	1	1,97	1	1	1	1	1	2,75	MATE efflux family protein	x			
At5g67330	a	1	1	2,38	1	1	1	1,83	1	1	1	1	1	1	NRAMP metal ion transporter 4 (NRAMP4)		x	x	
At1g60960	b	0,57	1	0,4	1	1	1	0,25	0,6	1	1	0,52	1	0,53	Metal transporter. putative (IRT3)	x			
At4g30190	a	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,5	ATPase 2 putative	x			
At2g41560	a	0,58	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,56	Calcium-transporting ATPase 4 (ACA4)	x	x		
At1g53210	a	1	1	1	1	1	1	1	0,6	1	1	1	1	1	Sodium/calcium exchanger family protein	x	x		x
At5g15090	a	1	1	0,59	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	Voltage-dependent anion-selective channel putative	x	x	x	
At3g26520	a	1	1	1	1	1	1	0,44	1	0,65	0,59	1	1	0,12	gamma tonoplast intrinsic protein (TIP1.2)	x	x		
At2g36830	a	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,21	gamma tonoplast intrinsic protein (TIP1.1)	x	x		
At3g16240	a	1	1	1	1	1	1	1	0,55	0,51	1	1	1	0,28	delta tonoplast integral protein (TIP2.1)	x	x		
At4g17340	a	1	1	1	1	1	1	1	0,52	0,4	1	1	0,52	0,2	delta tonoplast integral protein (TIP2.2)	x	x		
At3g61430	a	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,56	0,24	Plasma membrane intrinsic protein 1A (PIP1A / PIP1.1)		x		
At2g45960	a	1	1	1	1	1	1	1	0,61	1	1	1	1	0,35	Plasma membrane intrinsic protein 1B (PIP1B / PIP1.2)		x		

Locus	id	FEUILLES						RACINES						Fonction	Ja	Ca	Sh	Sz
		5 μM Cd			50 μM Cd			5 μM Cd			50 μM Cd							
		2 h	6 h	30 h	2 h	6 h	30 h	2 h	6 h	30 h	2 h	6 h	30 h					
At4g35100	a	1	1	0,59	1	1	0,54	1	0,63	1	1	0,53	0,2	Plasma membrane intrinsic protein (SIMIP / PIP2.7)				x
At2g23150	a	1	1	1	1	1	1,82	1	0,48	1	1	1	1	NRAMP metal ion transporter 3 (NRAMP3)	x			x
Signalisation / Régulation protéique																		
At1g18210	a	1	1	1	1	1	2,3	1	1	1	1	1	1	Calcium-binding protein. putative			x	
At2g33380	a	2,1	1	1	1	1	2,6	1	1	1	1	1	1	Calcium-binding RD20 protein (RD20)			x	
At5g61790	a	2,77	1	1	2,23	1	2,62	1	1	1	1	1	1,75	Calnexin 1 (CNX1)	x	x		x
At1g76530	a	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1,95	Auxin efflux carrier family protein			x	
At1g69840	a	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2,11	Band 7 family protein	x	x	x	
At3g01290	a	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2,3	Band 7 family protein	x	x	x	
At5g01820	a	1	1	1	1	1	1	1,65	1	1	1,75	1	3,63	CBL-interacting protein kinase 14 (CIPK14)			x	
At1g06840	a	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2,75	LRR transmembrane protein kinase putative	x			
At4g17530	b	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1,93	Ras-related GTP-binding protein. putative	x	x		
At3g22060	a	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1,82	Receptor protein kinase-related			x	
At5g44020	a	1	1	1	1	1	1	1	0,62	0,54	1	1	0,39	Acid phosphatase class B			x	
At3g20500	a	1	1	1	1	1	1	1	0,55	1	1	1	1	Calcineurin-like phosphoesterase	x			
At1g78230	a	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,54	Leucine-rich repeat protein			x	
At1g48480	a	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,49	LRR transmembrane protein kinase putative	x			
At1g16920	a	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,47	Ras-related GTP-binding protein putative	x			x
At5g47520	a	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,58	Ras-related GTP-binding protein putative	x			
At3g19820	a	1	1	1	1	1	1	0,57	1	1	0,59	1	0,6	Cell elongation protein / DWARF1 / DIMINUTO (DIM)	x	x	x	
At5g13710	a	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,56	Sterol 24-C-methyltransferase			x	
At2g03510	a	1	0,64	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	Band 7 family protein	x			
Protéines de réponse au stress																		
At2g47730	a	1,87	1	1	1,99	1	1	1	1,51	1	1	2,27	1	Glutathione S-transferase 6 (GST6)	x			
At1g78380	a	1	1	1	1	1	1	1	1,6	1	1	1,71	1	Glutathione S-transferase putative	x			
At3g24170	a	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3,68	Glutathione reductase putative	x			

Locus	id	FEUILLES						RACINES						Fonction	Ja	Ca	Sh	Sz
		5 μM Cd			50 μM Cd			5 μM Cd			50 μM Cd							
		2 h	6 h	30 h	2 h	6 h	30 h	2 h	6 h	30 h	2 h	6 h	30 h					
At5g40370	a	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1,85	Glutaredoxin, putative	x	x		
At3g09440	a	1	1	1	2,19	1	1	1	1	1	2,45	Heat shock protein (HSC70-3)	x				x	
At5g09590	a	1,8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	Heat shock protein (HSC70-5)	x					
At1g71695	a	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2,58	Peroxidase 12 (PER12)	x	x				
At3g49110	a	1	1,72	1	1	1,93	12,55	1	1	1	16	Peroxidase 33 (PER33)			x			
At5g06730	a	1	1	1	1	1	3,94	1	1,52	2,19	2,14	17,15	Peroxidase putative	x				
At2g30860	a	1	1	0,6	1	1	1	0,57	1	1	0,55	1	1	Glutathione S-transferase putative		x		
Autres protéines																		
At1g78680	a	1	1	1	1	1	1	1	0,37	0,51	1	1	1	gamma-glutamyl hydrolase (GGH1)	x	x		
At1g78660	a	1	1	1	1	1	1	1	0,58	0,6	1	1	1	gamma-glutamyl hydrolase putative	x			
At5g25250	a	1	0,56	1	1	1	4,53	1	2,62	2,33	2,53	8,51	Expressed protein					

### II.1.3.1 - Protéines de la signalisation cellulaire et de la régulation protéique

Parmi les protéines vacuolaires sélectionnées particulièrement intéressantes pour leur implication dans les mécanismes de la signalisation cellulaire on retrouve des protéines G, des récepteurs et des enzymes. Les protéines appartenant à des cascades de signalisation régulées par le cadmium ont été suivies. Certaines sont induites comme une protéine G (At4g17530), un récepteur de type *Leucine-Rich Repeat* kinase (At1g06840) et une kinase (At3g22060). D'autres apparaissent inhibées comme cet autre récepteur LRR-kinase (At1g48480), et ces protéines G (At1g16920, At5g47520) (Tableau VI).

Les protéines de type Band 7, bien caractérisées dans nos échantillons avec 12 protéines identifiées pourraient être des candidates intéressantes. Elles seraient impliquées dans la signalisation et la régulation de l'activité de protéines membranaires. Les deux Bands 7, At1g69840 et At3g01290, ont une expression induite dans les racines, après 30 h d'exposition à 50  $\mu$ M Cd (Tableau VI). Leur régulation à un niveau transcriptionnel est tardive de plus elle est effective pour des conditions de stress cadmium fortes. Cette famille de protéines n'apparaît donc pas essentielle à la mise en place des processus précoces de résistance au stress cadmium mais traduit probablement un remodelage cellulaire important à plus long terme.

Si l'on se focalise sur les protéines impliquées dans les mécanismes de signalisation cellulaire à court terme, seules 4 protéines présentent une régulation de leur expression dès 2 h d'exposition au cadmium. De récents travaux (Batistic *et al.*, 2010) ont montré qu'au cours de processus d'adaptation aux stress, les cellules mettent en place une réponse de signalisation *via* des cascades calciques non conventionnelles. Les principales composantes de cette réponse spécifique sont des protéines kinases (CIPKs) qui interagissent avec des protéines de type calcineurine B-like (CBL). Une kinase de type CIPK (*CBL-Interacting Protein Kinase*) a été identifiée par les travaux de Carter *et al.* (2004). Cette CIPK 14 est aussi induite dès 2 h d'exposition à 5 et à 50  $\mu$ M Cd avec des facteurs de 1,65 et 1,75 respectivement (Tableau VI). CIPK 14 est capable d'interagir avec CBL2 (*Calcineurin B-Like Protein 2*) (Akaboshi *et al.*, 2008), identifiée dans les gels bi-dimensionnels. D'autres protéines contribuant aux signaux calciques sont induites (At2g33380, At5g61790). Ces protéines de liaison au calcium pourraient constituer les intermédiaires d'une cascade de signalisation contribuant à la détoxification du cadmium. A moins que le cadmium n'entre en compétition avec le calcium et interfère dans les processus de signalisation comme lors de l'ouverture des stomates. En effet en entrant en compétition avec les canaux ioniques du

potassium et du calcium, le Cd y modifie la balance hydrique de la plante (Barcelo & Poschenrieder, 1990 ; Barbeoch *et al.*, 2002).

Enfin une dernière protéine de la signalisation cellulaire se révèle intéressante. DWARF1/DIMINUTO (At3g19820) est une enzyme impliquée dans la voie de biosynthèse des brassinostéroïdes (une classe d'hormone végétale). Elle présente une régulation transcriptionnelle négative lors d'un stress cadmium, de même qu'une autre enzyme de la voie de biosynthèse, une stérol-méthyltransférase (At5g13710). Ces résultats suggèrent la mise en place d'une voie de régulation brassinostéroïdes-dépendante lors d'un stress métallique impliquant des composantes vacuolaires.

### II.1.3.2 - Transporteurs

Les processus de transport des substrats vacuolaires et des toxiques à travers le tonoplaste sont des mécanismes clefs de la détoxification. La dynamique de l'expression des gènes codant pour des transporteurs, identifiés à la vacuole lors du stress cadmium, est particulièrement intéressante. Tout d'abord, les aquaporines, ces protéines sont parmi les plus abondantes du tonoplaste. L'expression des TIP (*Tonoplast Intrinsic Protein*) et des PIP (*Plasma Membrane Intrinsic Protein*) est majoritairement réprimée dans les racines lors du stress au cadmium. Dès 6 h d'exposition pour la plus faible concentration en cadmium (5  $\mu$ M Cd) le niveau ARN est réprimé pour TIP1.2, TIP 2.1, TIP 2.2 et TIP 2.7. Cette tendance se confirme à 50  $\mu$ M Cd notamment après 30 h d'exposition où toutes les aquaporines sont réprimées dans les racines (Tableau VI). Les aquaporines identifiées dans l'ensemble des travaux de protéomique vacuolaire considérés sont particulièrement réprimées. Ces données confirment l'impact du cadmium sur la balance hydrique de la plante (Poschenrieder *et al.*, 1989). Elles corroborent également la répression des aquaporines lors d'autres stress (Maurel *et al.*, 2008) et particulièrement le stress salin (Boursiac *et al.*, 2005).

Les travaux de Boursiac *et al.* (2005) mettent également en évidence par des expressions GFP une relocalisation des PIP au niveau du système vacuolaire. Il apparaît donc particulièrement intéressant de suivre ces aquaporines plasmalemmiques et de découvrir l'influence du stress cadmium sur ces protéines.

La régulation des niveaux de transcripts codant pour des transporteurs d'ions lors du stress au cadmium est plus hétérogène. Le canal ionique VDAC 3 (At5g15090), les transporteurs d'ions ATPasique (At4g30190, At2g41560 ACA4), ainsi que la pompe Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> (At1g53210) sont réprimés. Dans le cas d'IRT3, un transporteur de fer/zinc (Lin *et al.*, 2009),

la régulation négative au niveau transcriptionnel est marquée dès deux heures d'exposition à 5  $\mu$ M et à 50  $\mu$ M Cd dans les feuilles et les racines. Ce transporteur identifié dans nos analyses participerait à l'efflux du zinc et de métaux essentiels depuis la vacuole vers le cytosol en cas de carence. La régulation d'*IRT3* lors d'un excès de métaux lourds est d'ailleurs appuyée par les travaux de Talke *et al.*, (2006), qui observent une répression de l'expression d'*IRT3* lors d'un stress zinc. Les auteurs ne mentionnent toutefois pas de répression de l'expression du gène *IRT3* après une exposition à 30  $\mu$ M cadmium, le niveau de transcript étant stable dans ces conditions. Lors d'un stress, l'expression d'*IRT3* serait réprimée afin de limiter les fuites de cadmium vacuolaire en cours de séquestration.

Les transporteurs de fer de la famille Nramp (Thomine *et al.*, 2003) présentent eux une régulation transcriptionnelle positive dans les feuilles lors du stress cadmium. NRAMP3 et NRAMP4 sont induits après 30 h d'exposition à 50  $\mu$ M Cd avec des facteurs quasi similaires de 1,82 et 1,83. Le niveau ARN d'NRAMP4 est également induit après 30 h d'exposition à 5  $\mu$ M d'un facteur 2,38. Les transporteurs Nramp ont une localisation vacuolaire confirmée par des fusions traductionnelles avec la GFP (Thomine *et al.*, 2003). Au cours de la germination (Lanquar *et al.*, 2005) et en cas de carence (Thomine *et al.*, 2003), les NRAMP participent à l'efflux de fer depuis la vacuole. Les mutants *nramp3* présentent un phénotype de résistance au cadmium et une hypersensibilité au cadmium en cas de surexpression (Thomine *et al.*, 2000). Les Nramp permettraient le transport du fer et présenteraient également des capacités à transporter le Cd vers le cytosol. Le phénotype de sensibilité au cadmium observé serait dû une régulation positive de ces protéines en présence de cadmium entraînant un relargage de cadmium vacuolaire dans le cytosol.

Enfin les dernières classes de transporteurs sur lesquelles nous avons porté notre attention sont les transporteurs ABC (*ATP Binding Cassette*) et les transporteurs MATE (*Multidrug And Toxin Extrusion*). Ces transporteurs pourraient permettre le passage de toxiques ou de métabolites de la détoxification à travers le tonoplaste. L'expression des gènes de ces protéines est induite dans les racines après 30 h d'exposition à 50  $\mu$ M Cd. Les ABC sont particulièrement intéressants puisqu'ils appartiennent aux transporteurs vacuolaires de levure identifiés comme ayant une activité de transport des complexes PC-Cd.

Chez les levures, suite à la chélation cytosolique du cadmium par du glutathion (GS)<sub>2</sub>Cd ou des PC, les complexes sont transloqués dans la vacuole, *via* YCF1 (*Yeast Cadmium Factor 1*) chez *Saccharomyces cerevisiae* (Li *et al.*, 1997) et HMT1 (*Heavy Metal Transporter 1*) chez *Schizosaccharomyces pombe* (Ortiz *et al.*, 1992). Ces deux transporteurs appartiennent à la famille des MRP pour *multi-drug resitant protein*, cette sous-famille des



ABC transporteurs a été initialement identifiée dans des lignées cellulaires de cancer du poumon résistante aux traitements anti-cancéreux grâce à la découverte de MRP1 (Cole *et al.*, 1992). C'est l'observation de l'absorption de conjugués du glutathion dans des vacuoles d'orge qui a conduit à l'identification des MRP de plantes (Martinoia *et al.*, 1993). Par une étude minutieuse des transporteurs vacuolaires de type MRP, les uns après les autres, les équipes de Schroeder & Martinoia ont pu mettre en évidence un transport de complexes PC-Cd chez *A.t.* (MRP2 - Mendoza-Còzatl *et al.*, 2010). Ces résultats dévoilent enfin le mystère de la translocation du Cd complexé aux PC dans la vacuole végétale et donne un nouvel éclairage aux données transcriptomiques. Les transporteurs MRP sont induits pour les temps les plus longs (MRP6 : 30 h à 5  $\mu$ M et 50  $\mu$ M Cd, Tableau VI), voire, certaines fois, pour les concentrations les plus fortes uniquement (MRP2, MRP4 et MRP5 : 30 h à 50  $\mu$ M Cd, Tableau VI). Nos résultats ne font pas ressortir MRP2 comme candidat privilégié du transport du cadmium. Une des explications possible s'appuierait sur la durée du stress, le rôle de MRP2 est peut être essentiel entre 6 et 30 h ou pour un stress cadmium subit à long terme, 72 h et plus. Une autre hypothèse peut être émise si l'on considère une expression organe dépendante, seuls les racines et les feuilles sont évaluées ici. Or MRP2 présente une expression génique majorée dans certains tissus, d'après la base ePlant<sup>32</sup>, dans les organes reproducteurs femelles (Swanson *et al.*, 2005), les tubes polliniques (Qin *et al.*, 2009), les zones méristématiques (Yadav *et al.*, 2009) et les cellules de gardes (Yang *et al.*, 2008). MRP2 pourrait jouer un rôle essentiel dans ces mêmes tissus lors d'un stress cadmium. Le cadmium s'accumule majoritairement dans les racines avant d'atteindre les feuilles, la modulation de l'expression de MRP2 dans les cellules de garde serait donc tardive, 48 h et plus.

### ***III - Dynamique du protéome vacuolaire ciblée***

Parallèlement à l'étude sans *a priori*, une approche ciblée sur des protéines potentiellement impliquées dans la réponse au stress cadmium par Multiple Reaction Monitoring (MRM) a été développée. Cette approche MRM repose sur l'utilisation préférentielle de spectromètre de masse de type quadripolaire (QqQ, un QTRAP 4000 – ABSciex® dans notre cas). Elle permet de sélectionner, d'observer et de quantifier les variations de peptides tryptiques dits protéotypiques d'une protéine candidate dans différents échantillons biologiques. Ces peptides de par l'unicité de leur séquence en acides aminés sont

<sup>32</sup> ePlant est une base de données regroupant et permettant la visualisation des données d'expression géniques disponible sur les plantes <http://142.150.215.220/epland/>

caractéristiques des protéines étudiées, ils vont permettre à la fois de représenter et de distinguer nos protéines dans le mélange complexe de plusieurs milliers de protéines que constitue l'échantillon.

### III.1.1 - Résultats

L'étude ciblée des protéines potentiellement impliquées dans la réponse au stress cadmium par Selected Reaction Monitoring (SRM) a été réalisée à partir de la comparaison croisée des données quantitatives de transcriptomique de stress Cd obtenues au laboratoire PCV (Herbette *et al.*, 2006) et des données de protéomique vacuolaire (travaux de Szponarski *et al.* (2004), Shimaoka *et al.* (2004), Carter *et al.* (2004) et les nôtres). Cinquante-deux protéines dont les gènes présentent une variation significative de leur expression lors d'un stress cadmium ont été sélectionnées (Tableau VII).

Les peptides  $^{14}\text{N}$  /  $^{15}\text{N}$  sont sélectionnés et analysés par SRM. Les peptides signatures d'une protéine donnée sont détectés dès lors que les valeurs d'intensités mesurées dépassent le seuil de la limite de détection (LOD) (Lange *et al.*, 2008) soit une limite qui permet de définir la présence ou l'absence de l'analyte dans l'échantillon.

La LOD se définit selon la formule suivante :  $\text{LOD} = \text{Intensité du bruit de fond} \times n$

La valeur de  $n$  varie selon les auteurs de 3 à 5. Les protéines vacuolaires sélectionnées sont présentes dans mes échantillons pour la majorité à de faible niveau de concentration. Par exemple les TIP 1.2 et TIP 1.1 ont des valeurs de spectral count mesurées dans les échantillons membranaux de 4 et 8 respectivement. Étant donné les faibles niveaux d'expression de certaines protéines et le fractionnement sub-cellulaire poussé de nos échantillons (donc potentiellement peu contaminé) j'ai choisi de définir la LOD à 3 fois l'intensité du bruit de fond.

Les peptides signatures d'une protéine donnée sont considérés comme quantifiables dès lors que la valeur mesurée de leur intensité dépasse la limite de quantification (LOQ) (Lange *et al.*, 2008) soit une limite de concentration à partir de laquelle on considère le résultat comme fiable.

La LOQ se définit selon la formule suivante :  $\text{LOQ} = \text{Intensité du bruit de fond} \times n$

Dans le cas de la LOQ, la valeur de  $n$  varie selon les auteurs de 5 à 10. Mes échantillons contiennent un standard  $^{15}\text{N}$ , pour chaque transition est mesuré sous sa version  $^{14}\text{N}$  et  $^{15}\text{N}$ . La présence du standard interne  $^{15}\text{N}$  permet non seulement de doubler le signal mais aussi de

normaliser l'intensité de chaque transition assurant un indice élevé de confiance aux transitions mesurées. Afin de calculer un rapport des intensités  $^{14}\text{N} / ^{15}\text{N}$  pour chaque transition, j'ai défini la LOQ à 5 fois le bruit de fond.

Parmi les 52 protéines sélectionnées 17 protéines ont pu être quantifiées par SRM pour un stress de 2 h à 50  $\mu\text{M}$  (Tableau VII). Dix autres protéines (At1g18210, At1g78230, At2g33380 RD20, At2g36830, At2g45960 PIP 1.2, At3g22060, At4g17530 RAB1C, At4g30190 AHA2, At1g06840) ont été sélectionnées car elles avaient été observées dans certains travaux de MS/MS mais n'ont pas été détectées en MS/MS dans les échantillons  $^{14}\text{N} / ^{15}\text{N}$ . Malgré la sensibilité de détection en SRM, ces 10 protéines n'ont jamais pu être détectées en SRM.

Huit protéines (At1g76530, At1g78380 GSTU 19, At2g30860 GSTF9, At2g41560 ACA4, At2g47730 GST6, At3g61430 PIP1.1, At4g35100 PIP3, At5g01820 CIPK14) pourtant analysées en MS/MS dans les échantillons  $^{14}\text{N} / ^{15}\text{N}$  n'ont jamais pu être détectées par SRM dans ces mêmes échantillons  $^{14}\text{N} / ^{15}\text{N}$ .

Deux protéines, NRAMP4 At5g67330 et la purple acid phosphatase 18 At3g20500 observées en MS/MS et observées en SRM restent sous le seuil de détection.

Trois protéines de signalisation (RLK1 At1g48480, une glutaredoxine At5g90370 et RABA5a At 5g47520) non observées en MS/MS dans les échantillons  $^{14}\text{N} / ^{15}\text{N}$  sont détectées en SRM sans pouvoir les quantifier (<LOQ). Enfin 21 protéines sont détectées en MS/MS dans les échantillons  $^{14}\text{N} / ^{15}\text{N}$  et sont détectées en SRM sans pouvoir les quantifier (<LOQ) (Tableau VII).

Parmi les protéines sélectionnées on retrouve essentiellement des protéines membranaires, qui possèdent de nombreux segments transmembranaires très hydrophobes ou ayant peu de site de coupure tryptique. Ces protéines génèrent majoritairement des peptides ayant des propriétés physique (masse) ou chimique (hydrophobicité) qui ne sont pas détectable en MS. De plus dans de nombreux cas il s'agit de famille de transporteurs présentant de forte homologie (MRP, TIP), ce qui limite le nombre de peptides signatures observables. C'est le cas typique des aquaporines, les peptides signatures des gammas TIP n'étaient pas détectable par l'instrument, leur masse dépassé les limites de détection de l'instrument. L'utilisation d'autres enzymes de digestion (GluC LyC) n'a pas permis de définir de peptides protéotypiques ni en terme de gamme de masse détectable ni en terme d'unicité de la séquence. Seuls les deltas TIP ont pu être quantifiés en SRM (Tableau VII).

Afin que les résultats soit statistiquement pertinents, la quantification doit être réalisée pour au moins 3 transitions par peptides et sur 3 peptides protéotypiques. Le coefficient de variation des ratios de quantification SRM est calculé dès lors que 3 peptides sont quantifiés. Le seuil de garantie que j'ai fixé pour considérer que la répétabilité des mesures indépendantes de chaque peptide protéotypique soit fiable est de 25 %. J'ai donc considéré que les protéines pour lesquelles la moyenne des ratios de quantification présentait des Cv > 25 % ne présentaient pas un indice de confiance suffisant pour être comparé aux valeurs de transcriptomique. C'est le cas pour 2 protéines (VDAC At5g15090 et PTR2B At2g02040).

Parmi les 17 protéines qui ont pu être quantifié, le nombre de peptides protéotypiques détectés est inférieur à 3 pour 7 protéines. Les ratios ont été calculés pour 1 ou 2 peptides mais les coefficients de variation n'ont donc pas été déterminés. Enfin parmi les 8 protéines qui répondent à tous les critères de quantification par SRM, 6 protéines présentent des ratios de 1, ce qui signifie qu'il n'y a pas de différence de leur niveau d'expression protéique à 2 h, 50  $\mu$ M cadmium (Delta TIP 0,9 ; NaCa EXch 0,91 ; Plat LH2 0,91 ; NRAMP3 0,94 ; TAP2 0,98 ; Tableau VII). Ces niveaux d'expression protéique sont en adéquation avec les niveaux d'expression des gènes mesurés lors du stress cadmium 2 h, 50  $\mu$ M, indiquant que les niveaux d'expression de ces protéines ne sont pas affectés à un tel niveau de stress.

Enfin, trois protéines, MRP10 et la phosphatase B (Pase B) ont des ratios de 0,72 et DWARF1 0,88 indiquant une diminution de leur niveau d'expression lors d'un stress généré par 50  $\mu$ M de cadmium en 2 heures. Dans le cas de MRP10 et de la Pase B on observe donc un écart entre le niveau d'expression génique et le niveau d'expression protéique. Alors que les résultats de transcriptomique indiquent que leur niveau d'expression génique respectif n'est pas modifié au cours du stress, les résultats de protéomique indiquent une diminution de leur niveau d'expression lors du stress.

**Tableau VII : Résultats des expériences de dosages SRM pour les 52 protéines vacuolaires codées par des gènes dont le niveau d'accumulation de transcrits est régulé lors d'un stress cadmium.** Ce tableau reprend les valeurs indiquées dans le tableau I, deux informations supplémentaires sont ajoutées, il s'agit de Q SRM pour les valeurs de quantification SRM et du CV (%) pour coefficient de variation. Les CV sont indiqués uniquement lorsque la quantification a pu être réalisée avec au moins 3 peptides signatures. nd : non déterminé ; < LOQ : inférieur à la limite de quantification ; < LOD inférieur à la limite de détection

Locus	FEUILLES		RACINES		Fonction	Ja	Ca	Sh	Sz	<sup>15</sup> N	Q SRM	CV (%)
	5 $\mu$ M	50 $\mu$ M	5 $\mu$ M	50 $\mu$ M								
	2 h	2 h	2 h	2 h								
<b>Transporteurs</b>												
At5g39040	1	1	1,57	1	ABC transporter (TAP2)	x	x	x		x	0,98	23
At2g34660	1	1	1	1	ABC transporter (MRP2)	x		x		x	< LOQ	
At2g47800	1	1	1	1	ABC transporter (MRP4)	x	x	x	x	x	< LOQ	
At1g04120	1	1	1	1	ABC transporter (MRP5)	x				x	< LOQ	
At3g13090	1	1	1	1	ABC transporter (MRP8)	x				x	< LOQ	
At1g61890	2,2	1	1	1	MATE efflux family protein			x		x	< LOQ	
At1g71140	1	1	1	1	MATE efflux family protein	x				x	1,23	nd
At5g67330	1	1	1	1	NRAMP metal ion transporter 4 (NRAMP4)		x	x		x	<LOD	
At2g23150	1	1	1	1	NRAMP metal ion transporter 3 (NRAMP3)	x		x		x	0,94	12
At1g60960	0,57	1	0,6	0,52	Metal transporter. putative (IRT3)	x				x	< LOQ	
At4g30190	1	1	1	1	ATPase 2 putative (AHA2)	x					nd	
At2g41560	0,58	1	1	1	Calcium-transporting ATPase 4 (ACA4)	x	x			x	nd	
At1g53210	1	1	1	1	Sodium/calcium exchanger family protein (NaCaExch)	x	x		x	x	0,91	9
At5g15090	1	1	1	1	Voltage-dependent anion-selective channel (VDAC)	x	x	x		x	0,7	35
At3g26520	1	1	1	1	gamma tonoplast intrinsic protein (TIP1.2)	x	x				nd	
At2g36830	1	1	1	1	gamma tonoplast intrinsic protein (TIP1.1)	x	x				nd	
At3g16240	1	1	1	1	delta tonoplast integral protein (TIP2.1)	x	x			x	0,9	7
At4g17340	1	1	1	1	delta tonoplast integral protein (TIP2.2)	x	x			x	1,65	nd
At3g61430	1	1	1	1	Plasma membrane intrinsic protein 1A (PIP1A / PIP1.1)		x			x	nd	

At2g45960	1	1	1	1	Plasma membrane intrinsic protein 1B (PIP1B / PIP1.2)	x			nd	
At4g35100	1	1	1	1	Plasma membrane intrinsic protein (SIMIP / PIP3)		x		x	nd
<b>Signalisation / Régulation protéique</b>										
At1g18210	1	1	1	1	Calcium-binding protein, putative (CaBP)	x				nd
At2g33380	2,1	1	1	1	Calcium-binding RD20 protein (RD20)	x				nd
At5g61790	2,77	2,23	1	1	Calnexin 1 (CNX1)	x	x		x	0,31 nd
At1g76530	1	1	1	1	Auxin efflux carrier family protein (AuxinEC)			x	x	nd
At1g69840	1	1	1	1	Band 7 protein 7-1	x	x	x	x	1,42 nd
At3g01290	1	1	1	1	Band 7 protein 7-3	x	x	x	x	< LOQ
At5g01820	1	1	1,65	1,75	CBL-interacting protein kinase 14 (CIPK14)		x		x	nd
At1g06840	1	1	1	1	LRR transmembrane protein kinase putative (LRR)	x				nd
At4g17530	1	1	1	1	Ras-related GTP-binding protein (RAB1C)	x	x			nd
At3g22060	1	1	1	1	Receptor protein kinase-related (RPK)		x			nd
At5g44020	1	1	1	1	Acid phosphatase class B (PaseB)		x		x	0,72 12
At3g20500	1	1	1	1	Purple Acid Phosphatase 18 (PAP18)	x			x	<LOD
At1g78230	1	1	1	1	Leucine-rich repeat protein		x			nd
At1g48480	1	1	1	1	Receptor-like kinase 1 (RKL1)	x				< LOQ
At1g16920	1	1	1	1	Ras-related GTP-binding protein (RAB1)	x			x	< LOQ
At5g47520	1	1	1	1	Ras-related GTP-binding protein (RABA5a)	x				< LOQ
At3g19820	1	1	0,57	0,59	Cell elongation protein / DWARF1 / DIMINUTO (DIM)	x	x	x	x	0,88 5
At2g03510	1	1	1	1	Band 7 protein 7-2	x			x	< LOQ
<b>Protéines de réponse au stress</b>										
At2g47730	1,87	1,99	1	1	Glutathione S-transferase 6 (GST6/GSTF8)	x			x	nd
At1g78380	1	1	1	1	Glutathione S-transferase putative (GSTU19)	x			x	nd
At3g24170	1	1	1	1	Glutathione-disulfide reductase (GR1)	x			x	< LOQ
At5g40370	1	1	1	1	Glutaredoxin, putative	x	x			< LOQ
At3g09440	1	2,19	1	1	Heat shock protein (HSC70-3)	x			x	< LOQ
At5g09590	1,8	1	1	1	Heat shock protein (HSC70-5)	x			x	< LOQ

At1g71695	1	1	1	1	Peroxidase 12 (PER12)	x	x	x	< LOQ	
At3g49110	1	1	1	1	Peroxidase 33 (PER33)		x	x	2,93	nd
At5g06730	1	1	1	1	Peroxidase putative	x		x	1,61	nd
At2g30860	1	1	0,57	0,55	Glutathione S-transferase putative (GSTF9)		x	x	nd	
<b>Autres protéines</b>										
At1g78680	1	1	1	1	gamma-glutamyl hydrolase (GGH2)	x	x	x	< LOQ	
At1g78660	1	1	1	1	gamma-glutamyl hydrolase (GGH1)	x		x	< LOQ	

### III.1.2 - Discussion

Dans la majorité des cas, le niveau d'expression de transcription de l'ARNm et le niveau d'expression des protéines analysées sont corrélés, lors du stress cadmium 2h. Fait intéressant, mais pas surprenant, étant donné la fonction de cette protéine, dans le cas de la phosphatase acide B, le gène correspondant a été démontré n'ayant pas de régulation de son niveau d'ARNm à 2h tandis que le niveau d'expression de la protéine décroît. Cet écart observé, entre les concentrations de protéine et d'ARNm, pourrait être la conséquence d'une relocalisation *in cellulo* de la phosphatase acide B en réponse au stress Cd. La phosphatase acide B pourrait être exportée et recrutée, suite à l'activation d'une voie de réponse au stress cadmium.

Le transporteur MRP10 est un transporteur *multi-drug resistant protein*. MRP1, MRP2, et MRP3 sont tous les trois des transporteurs de conjugués du glutathion, du cytosol vers la vacuole (Lu *et al.*, 1997 ; Lu *et al.*, 1998 ; Tommasini *et al.*, 1998). Alors que MRP2 et MRP3 peuvent également transporter des catabolites chlorophylliens (Lu *et al.*, 1998), et bien que le plus proche homologue de MRP2 soit MRP1, ce dernier ne le peut pas. Cela indique clairement qu'*a fortiori* une homologie de séquence n'est pas nécessairement liée à une identité de fonction. MRP5 est exprimé dans le faisceau vasculaire et l'épiderme, en particulier dans les cellules de garde. Il a été suggéré pour fonctionner comme un régulateur de canal ionique (Gaedeke *et al.*, 2001), car contrairement aux plantes de type sauvage, le mutant *AtMRP5* ne présente pas d'ouverture des stomates, lors de l'addition de glibenclamide (drogue hypoglycémiante). Or, si MRP 10 permettait une détoxification du cadmium, du cytosol vers la vacuole, par le transport de conjugué de glutathion, son expression devrait avoir tendance à augmenter. Comme nous l'avons vu dans les résultats de transcriptomique, les aquaporines sont réprimées lors du stress cadmium. Cette répression des aquaporines, observée au cours d'autres stress chez les plantes (Maurel *et al.*, 2008), entraîne une diminution des apports en eau dans la vacuole. Si MRP 10 présentait des similarités de fonction avec MRP5, alors une diminution de l'expression de MRP 10 aurait une influence sur la balance hydrique en limitant l'entrée d'eau dans la vacuole lors d'un stress cadmium.

DWARF1 / DIMINUTO est une enzyme d'une voie de synthèse hormonale, il permet la conversion des stéroïdes en brassinostéroïdes. DWARF 1 est 'rasé' lors des expériences « shave and conquer », mais cette protéine possède un domaine transmembranaire, elle serait donc ancré au tonoplaste et tournée vers le cytosol, ce qui abonde dans le sens d'une synthèse



cytosolique des brassinostéroïdes. Les travaux de thèse de Florent Villiers montrent l'apparition d'un phénotype de tolérance au cadmium *in planta*, via l'inactivation de la biosynthèse des brassinostéroïdes. La diminution de l'expression protéique de cette protéine, en accord avec la diminution du taux ARNm, correspondrait à une régulation négative de la voie de synthèse des brassinostéroïdes.

Sur les 52 protéines sélectionnées, des premiers résultats de quantification, d'ores et déjà obtenus, sont prometteurs mais majoritairement ne révèlent pas de modifications du niveau d'expression des protéines après de 2 heures de stress au cadmium. J'ai donc tenté de préparer des échantillons de vacuoles ayant subi un stress cadmium pendant 24 h, 48 h ou 72 h afin de quantifier les protéines cibles au cours d'une cinétique de stress cadmium. Le protocole de préparation de vacuoles nécessite l'obtention de protoplastes. Or, lors de stress cadmium de 24 h et plus, la digestion de la paroi pecto-cellulosique n'a pas été possible. L'augmentation des concentrations d'enzymes de digestion, par rapport au protocole classique sur des cellules saines, est restée vaine. Dans une culture cellulaire, en l'absence de vaisseaux conducteurs, la première barrière face au cadmium est la paroi. La paroi est essentiellement composée de sucres, l'agencement de ces sucres est fortement lié à la présence de calcium. Le cadmium peut s'accumuler dans les parois, en prenant la place du calcium. Ma première hypothèse fut de penser que lors de la digestion des parois des cellules ayant subi de long stress cadmium, la libération progressive de cadmium dans le milieu de digestion entraîne une inhibition des enzymes de digestion, pectolyase et cellulase. Or, l'ajout d'agent chélateur d'ions divalent n'a pas permis de résoudre ce problème. Ma seconde hypothèse est associée à la capacité de liaisons entre le cadmium et la paroi. Le cadmium serait si fortement lié à la paroi, que par la forte cohésion de la paroi rendrait sa digestion par la cellulase et la pectolyase très difficile et insuffisante pour permettre de libérer des protoplastes. L'étude de ces autres conditions de stress n'a donc pas été possible.

L'une des solutions envisables est de réaliser un stress cadmium directement sur des protoplastes, avec des quantités plus faibles de cadmium, équivalent à stress en présence de la paroi. Même si au bout de 48 h et 72 h, la paroi sera de nouveau formée autour des protoplastes, le cadmium n'ayant pas pu s'accumuler dans celle-ci, une digestion de la paroi sera alors possible afin de préparer des vacuoles. Enfin, afin d'optimiser les résultats de quantification au cours d'une cinétique de stress cadmium, et d'espérer visualiser un plus grand nombre de protéines, il faut soit utiliser un instrument plus sensible soit posséder des échantillons biologiques plus concentrés. La deuxième option, étant la plus accessible, des

lysats de protoplaste desquels les protéines les plus abondantes telles que la Rubisco seraient éliminées par déplétion pourraient être utilisées. L'utilisation de colonne chromatographique de type micrométrique, présentant un volume de charge plus large, permettrait de charger des quantités importantes d'échantillons biologiques ( $>1 \mu\text{g}$ ), sans risque de boucher le système d'introduction de l'échantillon dans le spectromètre de masse et ainsi d'augmenter les concentrations des protéines dans l'échantillon que l'on souhaite quantifier.

La sélectivité des analyses en mode SRM, couplée à un système microLC, permettrait peut-être de quantifier l'ensemble de nos protéines vacuolaires d'intérêt, dans un échantillon complexe au cours d'un stress cadmium.

### III.1.3 - Conclusion

Sur les 52 protéines sélectionnées, les premiers résultats de quantification obtenus sont prometteurs mais demandent encore une optimisation afin d'affiner la quantification au cours d'une cinétique de stress cadmium. Il faut tout de même pondérer les comparaisons de niveau d'expression génique tissulaire par rapport aux niveaux d'expression protéique *in cellulo*. Il est probable que les effets du cadmium observés au niveau cellulaire, pour les protéines DWARF1, MRP 10 et la phosphatase B, soient différents des conséquences d'un stress cadmium *in planta*, sur des temps si court et inversement. Ces résultats sont encourageant et révèle que la SRM sur des échantillons  $^{14}\text{N} / ^{15}\text{N}$  est un puissant outil de quantification pour l'étude des protéines végétales.

## IV - Conclusion chapitre III

Dans le but de réaliser une étude de la réponse au stress, induit par un métal lourd, le cadmium, chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana*, nous avons utilisé plusieurs approches. Des approches de protéomique sans *a priori* ont été appliquées, comme les électrophorèses bidimensionnelles ou le marquage  $^{15}\text{N}$  afin de comparer le protéome de vacuole contrôle avec celui de vacuole ayant subi un stress. Des approches *ciblées* ont également été mises en place sur un nombre de protéines limité par une méthode SRM.

L'étude de la dynamique du protéome vacuolaire, lors d'un stress cadmium, par l'utilisation des cartographies, n'a pas révélé de différences quantitatives significatives des protéines vacuolaires. Les techniques les plus prometteuses de résultats sont sans doute les

techniques de marquage protéomique. L'utilisation du marquage métabolique à l'azote 15 est un puissant outil dans le domaine du végétal puisqu'il permet de marquer toutes les protéines au niveau cellulaire et de réaliser un marquage en amont de toutes les étapes de fractionnement et d'analyses que vont subir l'échantillon. Malheureusement pour le moment, les outils informatiques pour exploiter ce type de données ne sont pas encore à leur apogée. De plus, la majorité des outils actuels utilisés, pour traiter ces données, n'exploitent en réalité qu'une partie des données, puisque dans certains cas, seuls les peptides protéotypiques sont conservés. Il est également nécessaire que les protéines soient présentes dans les deux conditions pour être comparées et obtenir un ratio de quantification. En conséquence, toutes les protéines qui apparaissent ou disparaissent dans une condition, autrement nommées les « là, pas là », ne sont pas quantifiées, les ratios ne pouvant être calculés. Il est probable que ces données déchets contiennent des informations notables sur la perception du stress métallique par la cellule végétale et la cascade d'évènements mise en place pour lutter contre celui-ci.

Nous avons développé une étude ciblée, fondée sur une hypothèse de corrélation entre les données de transcriptomique stress cadmium et les données de protéomique vacuolaire. J'ai donc mis en place un pipeline d'analyse SRM, afin d'effectuer un profilage des taux d'expression des protéines vacuolaires par protéomique quantitative, des protéines dont les gènes présentent une expression régulée par le stress cadmium. L'approche SRM, nous a permis d'obtenir des données de quantification précise, d'une partie de nos protéines candidates. Nos résultats ont clairement montré que l'appariement des données de transcriptomique et de protéomique est une analyse nécessaire pour accroître les connaissances des effets physiologiques d'un stress ou tout autre mécanisme sollicitant une adaptation de la cellule ou des plantes.

Les premiers résultats obtenus, pour le point de cinétique de 2 h pour la concentration de 50  $\mu$ M cadmium, sont prometteurs. L'établissement d'une corrélation entre l'ARNm et sa protéine, pour des points de cinétique plus tardifs, permettra, sans doute, de mettre en évidence des protéines essentielles de la réponse au stress. Mais pour y parvenir, il faudra résoudre le problème physiologique de digestion de la paroi des cellules, lors d'un stress cadmium prolongé.

## *Conclusion générale et perspectives*

Le protocole de sous fractionnement cellulaire mis en place permet d'obtenir des vacuoles intactes et pures. La pureté des organites a pu être évaluée par des tests biochimiques, moléculaires et protéomiques. Ces préparations ont été utilisées pour déterminer le protéome vacuolaire dans des conditions de croissance cellulaire optimale et au cours d'un stress. Des analyses par spectrométrie de masse ont été réalisées indépendamment sur les fractions membranaires et solubles des vacuoles et ont été compilées dans une base de données At\_Vacuole. Cet outil informatique couplé au logiciel développé à EDyP permet d'exploiter les résultats des approches d'analyses à haut débit utilisées lors de mon travail.

L'utilisation d'un instrument de spectrométrie de masse capable d'atteindre des précisions de l'ordre de quelques ppm avec une haute résolution lors d'une expérience classique de protéomique est désormais possible grâce aux Orbitrap. Elle permet la détermination précise et exacte des masses de massifs isotopiques qui sont significativement différentes en termes d'abondance d'ions, mais qui se chevauchent dans le domaine des rapports  $m/z$ . La vitesse d'échantillonnage couplée à une grande précision de mesure fait d'un tel instrument un puissant analyseur capable de séquencer des protéines même faiblement exprimées ou présentes à cause de quelques contaminations.

Les analyses protéomiques de la vacuole réalisées au cours de ce travail ont débouché sur l'identification de 504 protéines à partir des extraits solubles, et de 1084 protéines à partir des extraits membranaires, soit 1334 protéines non redondantes. Les classes fonctionnelles mises en évidence dans la vacuole sont variées, et couvrent l'ensemble des fonctions physiologiques cellulaires. Elles concernent notamment le transport de métabolites, la signalisation, la réponse au stress, ou encore les processus de dégradation et de recyclage. Elles présentent la vacuole comme un organe complexe, particulièrement intégré au métabolisme cellulaire.

Des spectromètres de masse de plus faible résolution que les FT-ICR peuvent atteindre une haute exactitude, leur application est alors limitée à l'analyse de composés ciblés qui sont bien séparés dans le domaine  $m/z$ . C'est le cas des triples quadripôles lors des expériences de SRM *Selected Reaction Monitoring*. L'utilisation de cette méthode a permis de mettre en place

un pipeline d'analyse visant à comparer des données transcriptomiques et protéomiques. Le taux d'expression protéique de quelques candidats potentiels à la détoxification métallique vacuolaire a pu être défini.

Un autre aspect de mon travail a consisté à approfondir l'étude du protéome vacuolaire par des analyses visant à mieux comprendre son organisation : estimation de paramètres quantitatifs, détermination de la localisation de certaines protéines sur la face interne ou externe du tonoplaste, évaluation de l'organisation supramoléculaire des protéines. Pour cela, des cartographies du protéome soluble de la vacuole par électrophorèses bidimensionnelles IEF / SDS-PAGE ont été réalisées, et ont permis d'identifier les protéines principales de la vacuole. L'ensemble des analyses par spectrométrie de masse effectuée ayant mis en évidence un certain nombre de protéines connues pour être cytosoliques, nous avons initié une série d'analyses ayant pour objectif de déterminer l'origine de ces « contaminants ». La comparaison de cartographies par IEF / SDS-PAGE des protéomes du cytosol et de la fraction soluble de la vacuole a abouti à la conclusion que ces protéines n'étaient très certainement pas des contaminants aspécifiques, mais plus probablement qu'elles étaient présentes à l'intérieur de la vacuole. Les expériences de « shave and conquer » ont ainsi dissipé toute ambiguïté et mis en évidence que certaines protéines déjà identifiées chez d'autres organites pourraient avoir une fonction vacuolaire. Mais ces expériences ont aussi révélé que de nombreuses protéines sont associées au tonoplaste du côté cytosolique *via* des interactions spécifiques. Nous supposons que ces associations sont impliquées dans des processus cytosoliques faisant intervenir la vacuole, le protéasome, la subtilase TPPII et de nombreuses protéines de type 14-3-3, par exemple. Ces protéines seraient associées au tonoplaste pour faciliter certaines fonctions de dégradation et de signalisation. Le tonoplaste agirait donc comme une plateforme favorisant certaines associations protéiques en complexe.

Les électrophorèses en conditions non dénaturantes ont permis d'isoler un certain nombre de complexes putatifs, constitués de protéases et de glycosidases. L'ATPase vacuolaire ou encore le protéasome ont également pu être identifiés. D'autres complexes putatifs ont également été identifiés. Des expériences de validation de ces complexes par microscopie ou purification d'affinité sont nécessaires afin de confirmer leur présence et leur fonctionnalité.

Lors d'un stress métallique, la plante est capable de mettre en place une série de processus physiologiques aboutissant à l'excrétion ou à la compartimentation des toxiques. L'étude de cette dynamique en réponse au cadmium, en particulier les mécanismes impliquant la vacuole a nécessité de mettre en place un certain nombre d'outils d'analyse de ce protéome en vue d'analyser son évolution lors d'un stress. Pour le moment les approches sans *a priori* sur des protéines de la vacuole n'ont donné que très peu de résultats, mais le potentiel des

techniques de marquage tel que le  $^{15}\text{N}$  émergera dans les années à venir grâce aux développements bioinformatiques. Lors des expériences de DIGE, 22 spots ont présenté une intensité différente suite à l'exposition des cellules à 50  $\mu\text{M}$  de Cd pendant 24 heures. Il s'agit malheureusement de spots minoritaires, qui n'ont pu être identifiés par spectrométrie de masse. Ces résultats attestent néanmoins d'une évolution du protéome vacuolaire provoquée par le stress Cd, et la très faible proportion de protéines affectées (22 spots) suggère une réponse relativement spécifique. L'observation de la dynamique du protéome vacuolaire au cours d'un stress via l'utilisation d'un marquage semble être une méthode particulièrement adaptée à l'identification de protéines vacuolaires impliquées dans la détoxification. Cette dynamique est observable à plusieurs échelles, et pourra être évaluée *via* différentes méthodes, dont certaines, notamment la SRM, ont été développées dans ce travail.

L'étude de l'évolution du niveau d'accumulation des protéines est un aspect particulièrement prometteur dans les études engagées. Celle-ci permet de vérifier la corrélation entre les niveaux de régulations transcriptionnelle et traductionnelle des protéines de la vacuole. Le pipeline mis en place permettra ainsi d'identifier des protéines qui ont un rôle important dans la lutte contre le stress métallique.

L'ensemble de ce travail de thèse a permis de mettre en place un certain nombre d'outils, qui pourront faciliter à l'avenir l'étude du protéome vacuolaire, et en particulier sa réponse au stress. Toutefois de nombreuses études restent encore à réaliser avant d'identifier les voies protéiques vacuolaires de la détoxification métallique. Le fonctionnement de cet organite, notamment son interaction avec le reste de la cellule, et en particulier le cytosol sont autant de voies à explorer. Ce travail a contribué à l'effort de caractérisation protéomique vacuolaire engagé depuis quelques années et a abouti à l'établissement de plusieurs profils protéiques de référence, mettant en évidence de nouvelles facettes de la vacuole végétale.

Pour résumer, nous venons de le voir, les vacuoles sont des compartiments cellulaires uniques en termes de diversité des protéines qu'elles contiennent. Y sont présentes des hydrolases, des lectines, des inhibiteurs d'enzymes, des protéines de stockage, des protéines d'inhibition des ribosomes extrêmement toxiques... La présence d'enzymes dans les vacuoles, tels que des protéases, des nucléases, des glycosidases et lipases, permet la dégradation et le recyclage d'un grand nombre de composants cellulaires. Le suc vacuolaire, ce milieu acide entretenu par les très étudiées « pompes à proton », est entouré par une membrane, le tonoplaste. Le rôle de cette membrane est évident : elle circonscrit la zone de digestion, empêchant les enzymes vacuolaires d'hydrolyser le cytoplasme dans lequel se déroule la synthèse protéique. Pour remplir convenablement ce rôle, la membrane doit être elle-même

résistante à la digestion. C'est là une propriété étonnante, qui doit dépendre d'une conformation particulière de la face interne de la membrane, car celle-ci une fois altérée s'avérerait digestible et donc poreuse. La vacuole a également un rôle prépondérant dans la protection de la cellule en permettant la dégradation de xenobiotiques et en excluant les composés qui pourraient interférer dans le bon fonctionnement des voies métaboliques. Les métabolites en excès qui deviendraient dangereux s'ils étaient accumulés dans un autre compartiment y sont conjugués. Le tonoplaste a donc un rôle de barrière, il permet la séquestration des composés toxiques. Enfin la vacuole assure aussi le stockage de nombreux éléments moléculaires et métabolites essentiels tels que de l'eau, des acides aminés, du calcium, des sucres, des pigments (anthoxantines et anthocyanines) ... Le tonoplaste possède donc une batterie de transporteurs qui permettent un passage spécifique de ces divers composés. Or comme je l'ai mentionné dans l'introduction la vacuole représente seulement 3 % des protéines de la cellule. Devant toutes ces activités, plusieurs questions se posent : Existe-il une spécificité et une forte sélectivité des transporteurs tonoplastiques ? Peut-on y retrouver des analogues aux divers transporteurs de la membrane plasmique ? Quels sont les substrats de la digestion vacuolaire et comment passent-ils la barrière membranaire ? Et enfin quel est le devenir des produits de leur digestion ? Sont-ils recyclés et exportés vers le cytosol via d'autres transporteurs ?

Il est possible qu'aucune évolution quantitative du protéome et plus particulièrement des transporteurs membranaires ne soit observable lors des analyses différentielles. Certaines modifications post-traductionnelles (PTMs) des protéines de la vacuole suite à un stress métallique pourraient engager les protéines dans des mécanismes de tolérance. Les protéines subissent des modifications post-traductionnelles par l'ajout de sucres par exemple ou de phosphorylations qui jouent un rôle essentiel dans la modulation de la fonction des protéines. Les PTMs sont nombreuses (plus de 300 ont été dénombrées). Elles peuvent être statiques ou dynamiques. En conséquence, un unique gène peut encoder jusqu'à une cinquantaine d'espèces protéiques. Ainsi, l'analyse de la séquence d'ADN ne peut pas prédire les formes actives d'une protéine. De même, la quantification des ARN ne reflète pas toujours les niveaux d'expression protéique correspondants. Au-delà de l'aspect génomique, il est clair que l'information apportée par le génome peut ne pas donner un profil précis de l'abondance des protéines, de leurs structures ou de leurs activités. La mise en place de méthode d'analyse des protéines phosphorylées par spectrométrie de masse pourrait être établie afin d'évaluer les phosphorylations / déphosphorylations qui peuvent intervenir lors d'un stress.

Dans un autre registre, pour décrire le réseau des protéases et leurs activités, de nouvelles approches à haut débit ont été développées en MS dans un domaine appelé dégradomique. Ce terme a été utilisé dès 2000 pour définir le répertoire de substrats d'une protéase à l'échelle du protéome. Puis cette définition a été étendue, par Lopez-Otin & Overall (2002), aux techniques génomiques et protéomique permettant l'identification et la caractérisation des protéases présentes dans un organisme, en incluant aussi leurs substrats et leurs inhibiteurs endogènes. Ils ont également proposé le terme dégradome pour englober deux concepts :

- ✓ l'ensemble des protéases exprimées à un moment donné ou dans des circonstances données par une cellule (un tissu ou un organisme) comme le dégradome d'un modèle donné,
- ✓ l'ensemble des substrats naturels d'une enzyme dans cette cellule (tissu ou organisme) comme le dégradome d'une protéase donnée.

Dans l'étude du dégradome vacuolaire, nous avons défini un ensemble de protéases exprimées par la cellule. Afin de parvenir à une étude complète il est nécessaire d'identifier tous les éléments du réseau des protéases avec l'analyse de leurs partenaires et de leurs substrats. Des questions se posent comme la détermination des espèces présentant une activité réelle parmi elles? Ou la détermination des substrats de ces protéases et leurs produits de dégradation?

Le séquençage de nombreux génomes entiers de procaryotes et d'eucaryotes a suscité un regain d'intérêt pour la protéomique. L'étude de toutes les protéines produites par les cellules et l'organisme implique non seulement l'identification des protéines de l'organisme mais aussi la détermination de leurs rôles dans des fonctions physiologiques. L'identification des protéines fournit une image fixée à un moment *t* du protéome cellulaire ou subcellulaire identifié. Le challenge actuel de la protéomique réside dans la transition vers une connaissance plus mobile, une dynamique ou cinétique de l'évolution de ce protéome. Ce changement s'amorce grâce aux avancées en protéomique quantitative de plus en plus précise et à l'augmentation exponentielle des rendements d'identification des protéines en une analyse. La prise en compte des interactions avec d'autres protéines, de l'ADN, de l'ARN ou encore d'autres substances et enfin l'intégration des données venant des autres compétences de la biologie, génomique, transcriptomique, métabolomique vont permettre dans les années à venir de qualifier les organismes au plus proche de la réalité et espérons le d'atteindre le graal de la biologie des systèmes pour tous les organismes.



## *Annexes*

### **Annexe 1 : Principes techniques de spectrométrie de masse**

#### **I.1 - Séparation chromatographique**

Cette méthode aussi appelée chromatographie de partage sur phase apolaires utilise une phase stationnaire apolaire [silices greffées alkyle, copolymère styrène - divinylbenzène, pyrocarbone (graphite traité thermiquement)...] et une phase mobile polaire (principalement des mélanges eau-méthanol ou eau-acétonitrile).

Le pouvoir de séparation par chromatographie à polarité de phases inversée (RPLC) et la très bonne compatibilité des solvants utilisés avec la spectrométrie de masse a conduit à son usage généralisé pour la séparation des peptides depuis le milieu des années 80. Grâce aux efforts de miniaturisation des colonnes et à l'introduction des techniques d'ionisation douce, la RPLC couplée à la MS est devenue la technique analytique de choix dans le domaine de la protéomique. À partir d'une quantité d'échantillon limitée, des centaines de peptides peuvent être séparés afin d'être fragmentés, identifiés et quantifiés en routine avec une haute sensibilité.

Cependant, lors de l'analyse de mélange complexe, l'échelle de temps imposée par ce couplage en ligne peut limiter la quantité de données rassemblées. En effet, l'analyse par spectrométrie de masse alterne un scan MS sur l'ensemble de la gamme de masse avec des scans MS/MS des précurseurs les plus abondants. Plus la résolution de la séparation LC est grande, plus les pics sont fins. Le temps pour analyser les composants d'un pic est donc de plus en plus court : si la MS/MS dure trop longtemps, l'élution d'un pic peut être terminée au prochain scan MS et tous ses composants n'auront pas pu être fragmentés. Le développement d'analyseur MS de plus en plus résolutif et de vitesse d'échantillonnage accrue ou de gradient adapté à demande permettent de s'affranchir de tels problèmes.

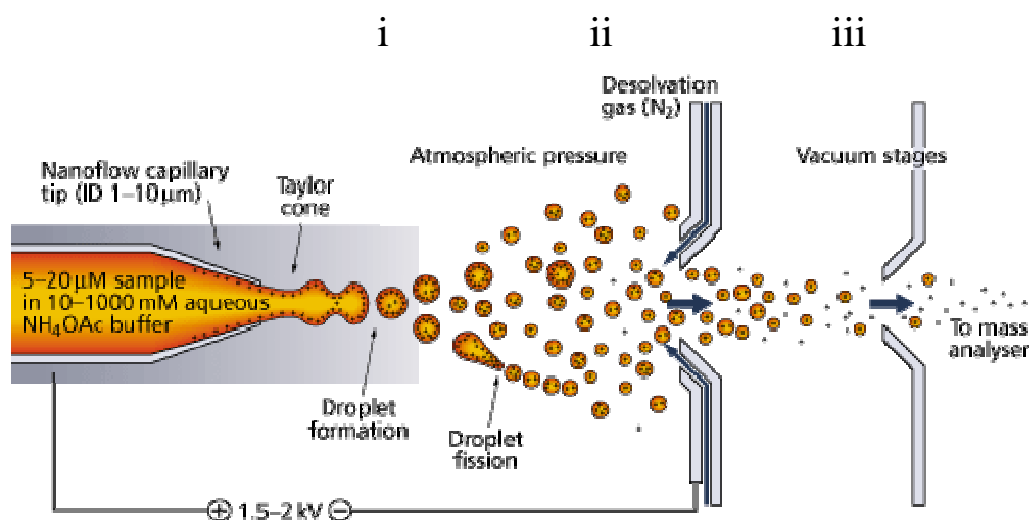
Dans le cadre de nos travaux nous avons essentiellement travaillé avec des appareils équipés de source électrospray.

## I.2 - La Source électrospray

### I.2.1 - Le Principe

L'ionisation électrospray génère à partir d'un échantillon en solution, à pression atmosphérique, des ions en phase gazeuse. Le mécanisme d'ionisation électrospray se scinde en trois étapes majeures (**Figure 68**):

- i. La production de gouttelettes chargées
- ii. La fission de gouttelettes chargées en gouttelettes de plus petites tailles par explosion coulombiennes successives
- iii. Le transfert des ions solvatés en phase gazeuse vers l'analyseur



**Figure 68 : Représentation schématique d'une source électrospray.** (Source wikimedia domaine public)

Dans notre cas, lors d'une ionisation électrospray, l'échantillon est solubilisé dans un solvant organique à pH acide (pH = 2) et amené par un fin capillaire dans la source à pression atmosphérique. L'extrémité du capillaire étant portée à un haut potentiel, il en résulte un champ électrostatique entre l'extrémité du capillaire et la contre-électrode qui fait migrer les charges à l'extrémité du capillaire. Les ions migrent à la surface du liquide, jusqu'à l'extrémité du capillaire où un spray est formé de gouttelettes chargées. Les gouttelettes chargées sont ensuite désolvatées, puis séchées par un gaz nébuliseur. La taille de la goutte diminue de plus en plus

jusqu'à devenir instable (limite de Rayleigh). Les gouttelettes subissent alors des explosions coulombiennes, se transforment en microgouttelettes puis en nanogouttelettes. Finalement les répulsions électrostatiques deviennent assez fortes pour provoquer la désorption des ions. La série d'éclatement de la goutte conduit à la production d'ions en phase gazeuse qui sont alors envoyés vers l'analyseur du spectromètre de masse (Kearle et Tang, 1993). Les ions générés en ESI portent généralement plusieurs charges et sont de type  $(M+nH)^{n+}$ .

#### *La formation du spray*

Le spray est formé par la différence de potentiel entre l'extrémité du capillaire et la contre-électrode (de 2 à 6kV). Le champ électrostatique qui en résulte induit la migration des ions positifs et négatifs. Si le capillaire est considéré comme étant la cathode, les ions positifs vont migrer vers l'extrémité du capillaire. Les forces de répulsion des charges vont alors augmenter et dépasser la tension de surface du solvant. Il y a formation d'un ménisque qui va s'étendre en suivant les lignes de champ électrique, c'est le cône de Taylor (**Figure 68**). Lorsque le champ électrique à l'extrémité de ce cône sera assez important, de fines gouttelettes sont émises. La source électrospray peut être apparentée à une cellule électrolytique dans laquelle se passe une réaction d'oxydoréduction entre le capillaire et le solvant. Ce mode de création de gouttelette est appelé « mécanisme électrophorétique ».

#### *La fission des gouttelettes*

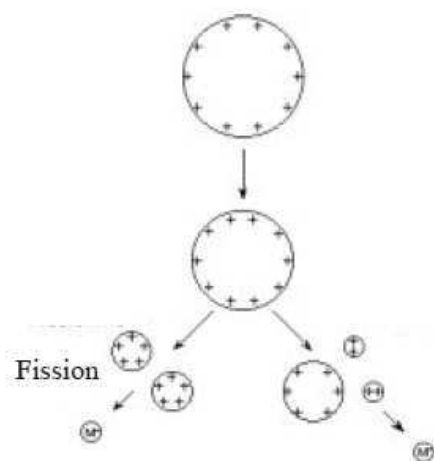
Les gouttelettes du spray sont progressivement évaporées avec l'aide d'un gaz nébuliseur (un flux d'azote rideau chauffé circulant à contre-courant) et de la température de l'interface. Les charges, qui restent constantes, se concentrent alors dans la goutte dont le rayon diminue. Les forces de répulsion coulombiennes (forces de répulsions électrostatiques) augmentent jusqu'à devenir supérieures aux forces de cohésion de la goutte. Lorsque la limite de Rayleigh est atteinte, une fission coulombienne a lieu, la gouttelette explose en gouttelettes filles. Les gouttelettes filles présentent des densités de charges différentes. Ce phénomène se répète plusieurs fois, les gouttelettes deviennent des microgouttelettes puis des nanogouttelettes (**Figure 68**)

### *La formation des ions en phase gazeuse*

Plusieurs modèles ont été proposés pour décrire les phénomènes qui conduisent du stade gouttelette d'un diamètre d'environ 10 nm à l'ion en phase gazeuse. Les deux principaux sont le modèle de Dole et le modèle d'Iribarne et Thomson.

#### œ Le modèle de Dole

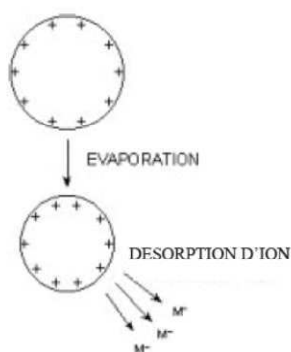
Il estime que si le processus de division par fission coulombienne va assez loin, et si la solution est suffisamment diluée, on finit par obtenir une goutte qui contient une seule molécule avec une ou plusieurs charges. Cette molécule passe alors sous phase gazeuse après évaporation du solvant (Dole *et al.*, 1968). C'est le modèle de la goutte sèche. (**Figure 69**)



**Figure 69 : Le modèle de Dole :** L'ion en phase gazeuse est produit suite à une ultime fission coulombienne. D'après Dole *et al.*, 1968

#### œ Le modèle d'Iribarne et Thomson

Ils ne penchent pas pour un éclatement de la gouttelette mais pour une évaporation ionique. L'ion serait extrait par désorption de champ (Iribarne et Thomson, 1976) (**Figure 70**).



**Figure 70 : Le modèle d'Iribarne et Thomson.** Le champ électrique à la surface de la goutte est si intense que l'ion est extrait par désorption de champ. D'après Iribarne et Thomson, 1976

Il n'est pas possible de conclure à un mécanisme précis quant à la création de l'ion en phase gazeuse, chaque modèle présentant des limites. Le modèle de Dole paraît compliqué à appliquer à des solutions très concentrées, quant au modèle d'Iribarne et Thomson, il est difficilement concevable pour des macromolécules biologiques pour des raisons cinétiques et thermodynamiques. Dans la pratique, le processus de création des ions pourrait dépendre de l'analyte et se rapprocher des deux modèles à la fois selon les cas. Les ions de haute masse seraient majoritairement produits d'après le modèle de Dole (de la Mora *et al.*, 2000 ; Cole 2000), alors que les petits ions semblent être générés par le modèle d'Iribarne et Thomson (Kearle & Tang 1993 ; Gamero-Castano & de la Mora 2000).

### I.2.2 - Le calcul de la masse

#### *Les états de charge*

Lors du processus d'ionisation de type électrospray des ions quasi-moléculaires sont créés par protonation ou déprotonation. Dans le cas des macro-biomolécules, des ions multichargés sont principalement observés et ces différents états de charge sont présents dans les spectres. Le nombre de charges dépend de la masse et des propriétés chimiques de la molécule, mais également du solvant utilisé.

À l'origine, les ions sont présents en solution sous forme d'anions ou de cations. En mode positif, les charges sont apportées par des protons  $H^+$  ou par des cations  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $NH_4^+$ , le plus souvent issus du solvant. Dans le cas de l'analyse de peptides, on considère que les charges positives sont issues de la protonation du groupement  $NH_2$  terminal et des résidus basiques (lysine, arginine et histidine) ou de la neutralisation des charges négatives.

Dans le cas des analyses en mode négatif, les charges négatives sont liées à la déprotonation des résidus acides (acide aspartique, acide glutamique) et du groupement COOH terminal ou à des contre-ions (Loo *et al.*, 1988).

### *Calcul de la masse*

Le spectre de masse d'une protéine correspond aux intensités relatives des ions multichargés en fonction de leur rapport  $m/z$ . Cette répartition statistique de tous les états de charge de l'échantillon a généralement l'allure d'une courbe de Gauss. La masse moléculaire est calculée à partir de deux états de charge consécutifs grâce à la résolution d'un système d'équations :

$$\begin{cases} m1 = (M + n) / n \\ m2 = (M + n + 1) / (n + 1) \end{cases}$$

Avec  $m1$  et  $m2$  les valeurs de  $m/z$  de deux pics consécutifs (avec  $m1 > m2$ ),  $M$  la masse du produit analysé et  $n$  l'état de charge du pic  $m1$ . Cette équation n'est valable que dans le cas où la charge est apportée par un proton.

Des logiciels de déconvolution permettent de réaliser ce calcul et d'obtenir ainsi un spectre déconvolué (ou spectre reconstruit) de la protéine qui représentera cette fois l'intensité en fonction du poids moléculaire et non plus en fonction du rapport  $m/z$ .

### I.2.3 - Conclusions ESI

L'ESI est un processus d'ionisation douce où très peu de fragments sont observés. C'est pourquoi, il est bien adapté à l'analyse de biomolécules.

Les avantages de l'électrospray incluent :

- ✓ une haute reproductibilité puisque il n'y a pas de processus de cristallisation,
- ✓ un couplage en amont en ligne avec les méthodes chromatographie liquide,
- ✓ une haute flexibilité quant au type de spectromètre de masse en aval. La formation d'ions multichargés génère des rapports  $m/z$  plus faibles ce qui rend possible le couplage avec des trappes ioniques et des quadripôles comme avec les cellules à résonance d'ion cyclotronique ou orbitélaire et les TOF.

En revanche, l'électrospray présente les inconvénients suivants :

- ✓ des spectres de masses complexes dus aux multiples espèces ioniques pour un même analyte,
- ✓ une consommation importante d'échantillon : ce problème a été relativement maîtrisé grâce à l'introduction des sources nano spray,
- ✓ l'électrospray ne peut pas être utilisé pour l'imagerie.

**Dans le cadre de ma thèse, j'ai été amené à utiliser deux types d'appareils : un QTRAP et un ORBITrap**

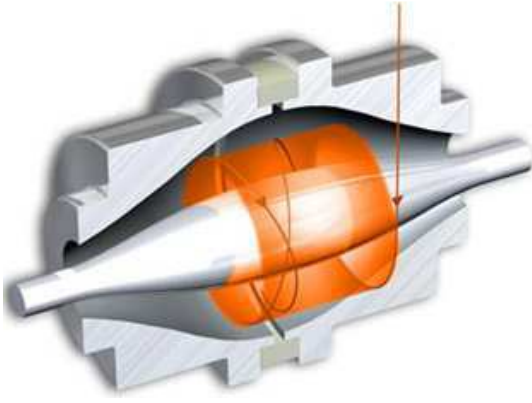
### **I.3 - Les analyseurs**

Les analyseurs ont pour fonction de séparer les ions précédemment créés en fonction de leur rapport  $m/z$ . Il existe une grande variété d'analyseurs. Les plus courants sont des analyseurs dits à balayage qui détectent les ions successivement au cours du temps. De plus en plus d'appareils sont équipés d'analyseurs hybrides, associant plusieurs types d'analyseurs, et combinant ainsi les spécificités intéressantes de chacun. Le choix d'un analyseur va dépendre principalement :

- ✓ de sa gamme de masse (la valeur limite du rapport  $m/z$  mesurable)
- ✓ de sa précision de mesure
- ✓ de sa résolution de masse (c'est la capacité à différencier des ions de rapport  $m/z$  voisins)

#### **I.3.1 - L'Orbitrap**

Le piège consiste en une électrode externe semblable à un baril et en une électrode centrale de forme fuselée le long de l'axe. Les électrodes axiales symétriques de l'Orbitrap génèrent un potentiel électrostatique « quadro-logarithmique » (**Figure 71**).



**Figure 71 : Géométrie de l'Orbitrap.** Equipotentiellles du champ quadralogarithmique ; exemple de trajectoire d'ion stable. Source : <http://planetorbitrap.com/technology.php>

### *Trajectoire des ions*

Le piégeage orbital des ions se fait dans un champ électrostatique donné par la distribution de potentiel suivante :

$$U(r,z) = \frac{k}{2} \left( z^2 - \frac{r^2}{2} \right) + \frac{k}{2} (R_m)^2 \ln\left(\frac{r}{R_m}\right) + C$$

Où C est une constante, k la courbure du champ et  $R_m$  le rayon caractéristique. Il s'agit de la superposition d'un champ quadripolaire dû à la trappe ionique et d'un champ logarithmique dû au condensateur cylindrique. Dans ce champ, les trajectoires stables couplent la rotation autour de l'électrode centrale avec des oscillations le long de l'axe ce qui résulte en une spirale complexe.

D'après les équations du mouvement écrites en coordonnées polaires de  $m\ddot{a} = -q\Delta(U(r,z))$ , on peut déduire que le mouvement selon l'axe z est indépendant du mouvement dans le plan (r,φ) :

$$\ddot{r} - r\dot{\phi}^2 = -\frac{q}{m} \frac{k}{2} \left( \frac{R_m^2}{r} - r \right)$$

$$\frac{d}{dt}(r^2\dot{\phi}) = 0$$

$$\ddot{z} = -\frac{q}{m} kz$$

Selon l'axe z, le mouvement est une simple oscillation de  $\omega_z = \sqrt{k \frac{q}{m}}$  . pulsation

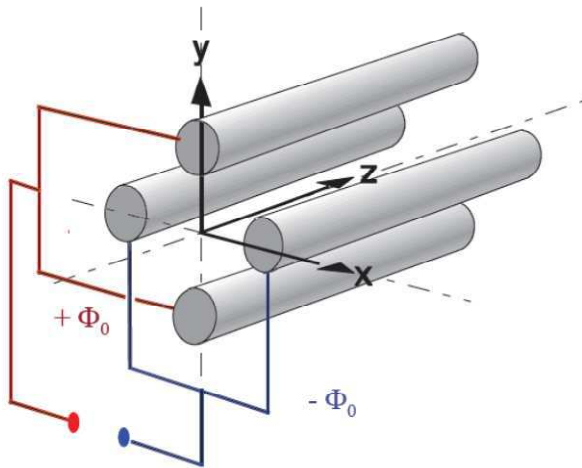


Cette oscillation suit donc une fréquence qui est inversement proportionnelle à la racine carrée du rapport  $m/z$  de l'ion analyse. Ce rapport  $m/z$  peut ainsi être calculé par transformée de Fourier inverse à partir de l'enregistrement du signal.

Ce type d'analyseur présente une grande résolution et une grande vitesse de balayage, il permet donc un très bon échantillonnage lors de l'analyse de l'échantillon.

### I.3.2 - Les analyseurs de type filtre quadripolaire.

Le principe de cet analyseur est d'utiliser la stabilité des trajectoires des ions dans le quadripôle en fonction des tensions qui y sont appliquées pour les séparer selon leur rapport  $m/z$ .



**Figure 72 : Schéma d'un analyseur quadripolaire.** (Source wikimedia domaine public)

Il est composé de quatre cylindres parallèles reliés électriquement deux à deux (Dawson *et al.*, 1986). Les deux paires de barres sont de polarité opposée, ce qui forme un champ électrique à deux dimensions (**Figure 72**). L'application simultanée d'une tension continue et d'une tension radiofréquence (RF) impose aux ions qui passent entre les cylindres un chemin oscillant. Pour des valeurs précises de tension et de radio fréquence, seuls les ions avec un rapport  $m/z$  donné peuvent atteindre l'extrémité des quadripôles et se diriger vers le détecteur.

Lorsque les ions entrent dans l'analyseur, ils subissent les forces résultantes du champ électrique total composé du champ alternatif quadripolaire superposé à un champ constant selon l'équation :  $\Phi = \pm (U \pm V \cos \omega t)$

où  $\Phi_0$  est la tension appliquée aux barres,  $\omega$  la fréquence angulaire,  $U$  la tension continue et  $V$  l'amplitude du voltage RF.

Ces forces vont alors définir les zones de stabilité des ions pour qu'ils soient transmis. Leur trajectoire va obéir à l'équation de Mathieu (résolue en 1865 par Émile Mathieu en étudiant les vibrations d'une membrane elliptique).

$$\frac{d^2 u}{d\xi^2} + (a_u - 2q_u \cos 2\xi) \cdot u = 0$$

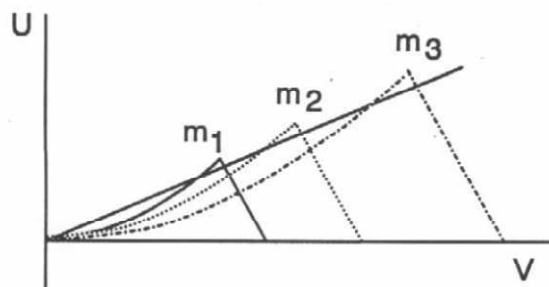
$$u = x \text{ ou } y, \xi = \omega t/2,$$

$$a_u = \frac{8zeU}{mr_0^2 \omega^2}; q_u = \frac{4zeV}{mr_0^2 \omega^2}$$

avec  $r_0$  : le rayon du cercle inscrit entre les 4 barres ;  $\omega$  : la fréquence angulaire telle que  $\omega = 2\pi f$  où  $f$  est la fréquence du champ alternatif ;  $m$  : la masse de l'ion ;  $ze$  : la charge de l'ion ;  $a_u$  et  $q_u$  : les solutions de l'équation différentielle de Mathieu.

Les ions vont donc être séparés en fonction de leur rapport  $m/z$ , par la variation de  $U$  et de  $V$ . Le champ électrique qu'elles vont créer va imposer aux ions une trajectoire oscillante selon  $x$  et  $y$ , tout au long de l'axe  $z$ . Pour que l'ion arrive jusqu'au détecteur, il suffira que les oscillations selon  $x$  et  $y$  ne dépassent pas  $r_0$ , le rayon du cercle inscrit entre les barres.

Ainsi un balayage de  $U$  et  $V$  avec  $U/V$  constant permet de détecter les différentes masses (**Figure 73**). Plus la pente de la droite sera élevée, meilleure sera la résolution.



**Figure 73 : Droites de fonctionnement d'un analyseur quadripolaire sur la première zone de stabilité.** D'après De Hoffmann *et al.*, 1994.

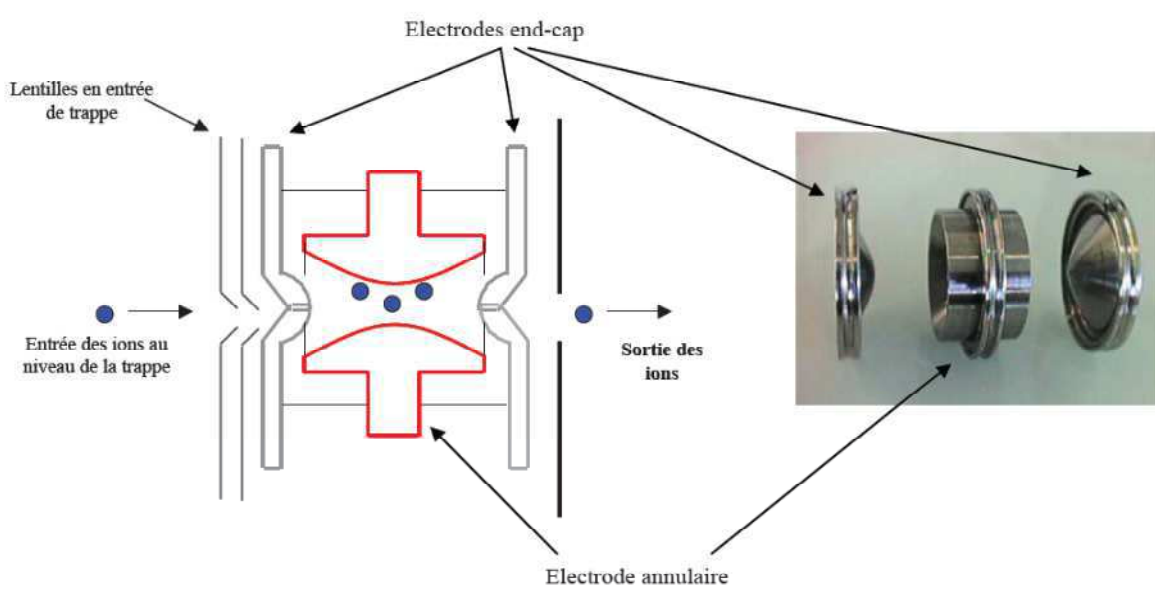
Par contre, dans ce type d'appareil, on peut noter que la résolution et la sensibilité sont inversement liées. À pente nulle, la résolution sera nulle, mais tous les ions seront transmis dès lors que la bonne tension  $V$  est appliquée, c'est le mode RF only très utilisé notamment dans le cadre du couplage de plusieurs analyseurs.

### I.3.3 - Les analyseurs de type piège à ions (trappe ionique)

La trappe ionique est en fait l'homologue en trois dimensions des analyseurs de type quadripolaires. A l'inverse du quadripôle, qui ne laisse passer que les ions d'un rapport  $m/z$  donné, le piège ionique accumule à l'intérieur de sa zone de champ tous les ions sélectionnés. La capacité de confinement des ions est liée à la formation d'un pseudo puits de potentiel. Les ions piégés sont ensuite libérés successivement suivant leur rapport  $m/z$ , cette libération intervient lorsqu'ils deviennent instables (McLuckey et al., 1994).

#### a) Structure de la trappe

Elle est composée d'une électrode centrale circulaire en forme de diabol (l'électrode annulaire), couverte de deux calottes hémisphériques (les électrodes end-cap) (De Hoffmann et al., 1994) (**Figure 74**).



**Figure 74 : Schéma et photographie d'un analyseur de type trappe ionique :** Il est constitué d'une électrode centrale circulaire en forme de diabol (électrode annulaire), couverte de deux calottes hémisphériques (électrodes end-cap).

La géométrie de ces électrodes est choisie pour se rapprocher au maximum d'un champ quadripolaire idéal lorsqu'un seul potentiel de type RF est appliqué sur l'électrode annulaire ; dans ce cas les électrodes end-cap restent à la masse et ne servent que dans les expériences de MS-MS pour l'isolation des ions. Dans la réalité, il semble qu'une tension soit tout de même appliquée sur les électrodes end-cap pour compenser la non-perfection géométrique du piège.

Comme dans le cas du quadripôle, la trajectoire tridimensionnelle des ions à l'intérieur du piège est imposée par un champ quadripolaire et elle peut être définie par l'équation de Mathieu. Cependant il convient d'ajouter une nouvelle dimension :  $z$ . Ainsi,  $u = x, y$  ou  $z$ , et une nouvelle composante,  $r$ , peut être définie telle que  $r^2 = x^2 + y^2$ .

#### *b) Le piégeage des ions*

Le piégeage peut se faire par l'application d'un potentiel RF sur l'électrode annulaire. Les ions ne vont pouvoir rester piégés que si leur trajectoire est stable simultanément axialement et radialement. La répulsion mutuelle des ions induisant des augmentations du rayon de leur trajectoire, il est nécessaire d'utiliser un gaz neutre, généralement de l'hélium, pour les confiner (McLuckey *et al.*, 1994). Cet hélium va également servir à refocaliser les ions lors de leur entrée dans la trappe en diminuant leur énergie cinétique.

#### *c) L'éjection des ions*

L'éjection des espèces ioniques de la trappe se fait selon cinq processus principaux :

- ✓ leur trajectoire peut se situer en dehors d'une zone de stabilité.
- ✓ leur trajectoire peut se situer à l'intérieur d'une zone de stabilité, mais l'amplitude d'oscillations des ions peut dépasser les limites géométriques de la trappe.
- ✓ les ions peuvent subir des collisions défocalisantes avec les particules contenues dans le piège.
- ✓ les effets d'espace de charge peuvent contribuer à la défocalisation des ions s'ils sont en trop grand nombre dans le piège.
- ✓ dans le cas le plus simple, l'éjection sélective des ions se fait par une déstabilisation axiale selon l'axe  $z$ . Il se produit donc un balayage de l'amplitude du potentiel RF défini par  $q_z$ . Les ions atteignent le  $q_{\text{ejec}}$  et sont ainsi éjectés séquentiellement selon des rapports  $m/z$  croissants.

## **I.4 - La fragmentation des ions**

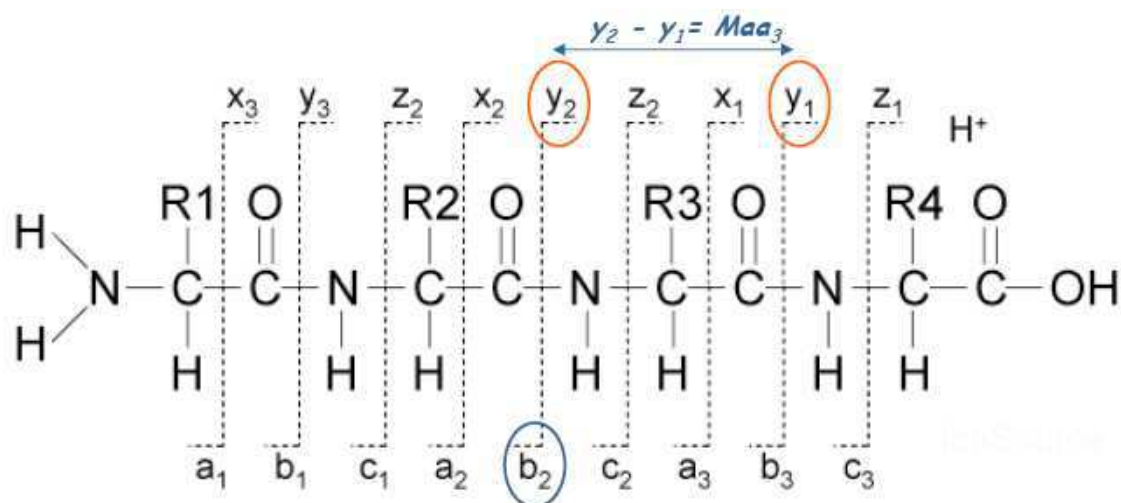
### **I.4.1 - Principe général**

Afin d'obtenir la séquence en acides aminés d'une protéine, il est nécessaire d'obtenir les profils de fragmentation des peptides et/ou des protéines. Cette fragmentation est le résultat d'une augmentation de l'énergie interne, l'ion parent (ou précurseur) va se dissocier et former des ions fils (ou fragments). Différentes méthodes ont été développées pour obtenir ces profils. Seule la fragmentation induite par collision (CID - *collision-induced dissociation*), technique utilisée au cours de cette thèse, sera développée.

La collision peut avoir lieu en source avec des molécules de gaz ou de solvant. La multiplicité des ions précurseurs alors concernés par la fragmentation, va générer de nombreux ions fragments. La filiation des ions sera alors difficilement établie et l'analyse des spectres d'ions fragments sera fastidieuse. Pour obtenir avec certitude l'identité des ions fragments, il est nécessaire de les isoler physiquement. Les spectromètres de masse tandem permettent cette isolation. Dans ces appareils, l'analyse se fait en deux phases : dans la première, les ions parents (ou précurseurs) sont sélectionnés, et dans la seconde les ions issus de sa fragmentation, appelés ions fils, sont analysés. Entre ces deux étapes a lieu la fragmentation, qui peut se réaliser dans des cellules de collision grâce à un gaz inerte avec lequel les ions entreront en collision.

La CID est la méthode de fragmentation des peptides la plus couramment utilisée (Hunt *et al.*, 1981 ; Papayannopoulos 1995). La fragmentation a lieu lorsque les peptides entrent en collision avec des molécules de gaz neutre (Argon, Hélium, Néon). Quand l'énergie de collision est assez haute pour convertir une partie de l'énergie cinétique en énergie vibrationnelle, la fragmentation de l'ion sélectionné peut être obtenue. Puisque la dissociation intervient lorsque l'énergie de collision est supérieure à l'énergie d'activation, on parle aussi de dissociation activée par collision (CAD - *collision-activated dissociation*). La fragmentation à basse énergie (10-100eV) intervient dans les quadripôles et les trappes ioniques, ce qui résulte en pertes de neutres et en ruptures des liaisons peptidiques (Hunt *et al.*, 1981). Lorsque le squelette peptidique est rompu, la charge peut être retenue du côté C- ou N-terminal du site de coupure. La nomenclature des ions fragments a été proposée par Roepstorff & Fohlman (1984) puis modifiée par Biemann (1990) (**Figure 75**). Le mécanisme CID à basse énergie est assez

compliqué et on suppose que la fragmentation est liée à la délocalisation des charges (Polce *et al.*, 2000 ; Wysocki *et al.*, 2000).



**Figure 75 : Nomenclature des ions issus de la fragmentation peptidique par spectrométrie de masse en tandem**

Les différentes étapes d'analyse de la MS-MS peuvent se faire dans des analyseurs distincts, l'un sélectionnant l'ion parent, l'autre analysant les ions fils, on parle alors de MS-MS dans l'espace. C'est le principe par exemple utilisé dans les triples quadripôles, dans les analyseurs hybrides (de type Q-TOF par exemple) ou dans les TOF-TOF. Mais les deux étapes peuvent également se dérouler dans un même analyseur, c'est la MS-MS dans le temps, mise en œuvre dans les trappes à ion.

#### I.4.2 - La fragmentation dans l'espace : cas des triples quadripôles (QqQ)

Ce type d'appareil est constitué de trois quadripôles. Le premier quadripôle va sélectionner l'ion parents, et le troisième va analyser les ions fragments. Le second quadripôle servira de cellule de collision. Il travaillera alors en mode « RF only ». De ce fait, les ions seront focalisés et transmis avec une grande efficacité. Selon les modes de balayages des quadripôles Q1 et Q3, plusieurs types d'expériences pourront être réalisés :

- ✓ Si une tension fixe est appliquée en Q1, et un balayage de tension en Q3, le spectre obtenu sera un spectre d'ions fils. Pour un précurseur particulier choisi en Q1, les ions fragments sont recherchés (mode SRM).
- ✓ Si un balayage de tension est réalisé en Q1 et une tension fixe appliquée en Q3, un spectre d'ions précurseurs sera obtenu. Les différents ions parents qui donnent le même ion fixe seront identifiés par cette méthode (mode MS/MS).

- ✓ Si un balayage de tension est effectué en Q1 et en Q3, un spectre de perte de neutre sera obtenu. Les deux quadripôles balayent simultanément la gamme de masse en laissant une différence de masse constante entre eux. Le spectre de masse permettra alors de déterminer tous les ions fragments qui ont perdu une molécule, par rapport à leur précurseur, d'une masse égale à la différence de balayage (mode perte de neutre).

#### **I.4.3 - La fragmentation dans le temps : cas des trappes ioniques**

Dans ce type d'appareil, un seul analyseur est utilisé à la fois pour l'isolation des précurseurs, leur fragmentation et l'analyse des ions fragments. Plusieurs processus concernant l'isolation de l'ion précurseur sont décrits (Bonner 1977 ; Strife *et al.*, 1988).

- ✓ L'isolation du précurseur peut se faire par l'augmentation linéaire de l'amplitude RF et de la tension auxiliaire jusqu'au seuil de coupure juste inférieur à celui correspondant au rapport  $m/z$  de l'ion précurseur. Les ions de rapport  $m/z$  inférieurs sont donc ainsi déstabilisés et éliminés. Les ions de rapport  $m/z$  supérieurs au  $m/z$  de l'ion précurseur sont éliminés par l'addition d'une tension continue au potentiel RF.
- ✓ La fragmentation de l'ion précurseur se fait par l'application d'une tension alternative et à l'aide de l'hélium. La trappe ionique contiendra alors les ions fils, qui seront expulsés séquentiellement de la même manière que lors d'une expérience de MS simple.

### **I.5 - L'interprétation et la validation des données**

Aujourd'hui, la majorité des données protéomique sont associées aux analyses en MS et en particulier via l'utilisation de spectromètres de masse en tandem dont les performances s'améliorent continuellement (Domon & Aebersold, 2006). Ces instruments peuvent générer des centaines voire des milliers de spectres de fragmentation par heure d'acquisition. L'attribution d'une séquence peptidique à ces spectres, la déduction des protéines représentées par les peptides identifiés et la détermination de leur abondance dans l'échantillon étudié offrent d'importants défis informatique et statistique (Nesvizhskii & Vitek & Aebersold, 2007).

L'attribution correcte d'une séquence peptidique à un spectre de fragmentation expérimental est la première étape, et l'une des plus cruciales, du traitement des données en protéomique. De nombreuses approches informatiques et de nombreux outils logiciels ont été développés pour attribuer automatiquement les séquences peptidiques aux spectres de fragmentation. Ces logiciels peuvent être classés en trois catégories (Kapp & Schutz, 2007):

- ✓ Les recherches dans les banques : les peptides sont identifiés en corrélant les spectres acquis avec les spectres théoriques prédits pour chaque peptide contenu dans la banque de séquence protéique ou en corrélant les spectres acquis avec des bibliothèques de spectres MS/MS expérimentaux préalablement identifiés.
- ✓ Le séquençage de novo ou la séquence peptidique est explicitement lue à partir du spectre de fragmentation.
- ✓ Des approches hybrides, comme celles basées sur l'extraction d'une information de séquences de 3 à 5 résidus (PST - *peptide sequence tag*), suivie d'une recherche dans les banques en *error tolerant*.

Dans le cadre d'étude protéomique à grande échelle, la première stratégie (recherche dans les banques de données) reste la plus fréquemment utilisée, c'est également celle que nous avons utilisé et la seule décrite ici.

### **I.5.1 - Les identifications par recherche dans les banques**

Différents programmes de recherche dans les banques MS/MS ont été développés, les plus courants sont SEQUEST <http://www.thermo.com> ; Mascot <http://matrixscience.com> et Phenix <http://www.phenix-ms.com>.

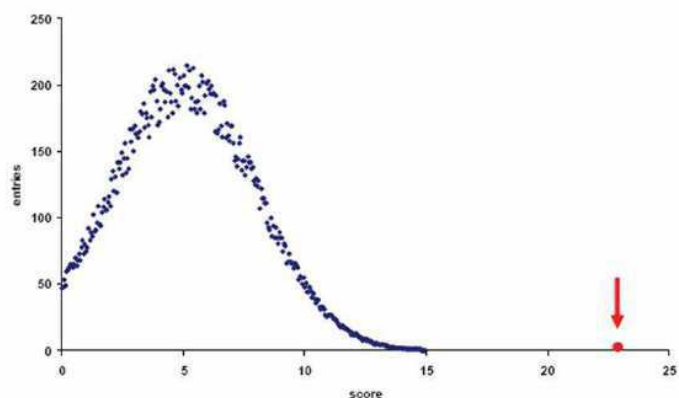
Ces logiciels prennent chaque spectre expérimental en entrée et lui attribuent un score en le comparant aux profils théoriques de fragmentation des peptides de la banque de données. Le nombre de peptides candidats est réduit en fonction des critères spécifiés par l'utilisateur comme la tolérance de masse, l'enzyme de digestion, les modifications chimiques ou post-traductionnelles autorisées. En sortie les logiciels génèrent une liste de séquences peptidiques classées selon leur score de corrélation avec le spectre expérimental. Ce score mesure le degré de similitude entre le spectre expérimental et le spectre théorique et sert de premier paramètre pour discriminer les identifications correctes de celles qui sont fausses. Seul le logiciel Mascot® que nous avons au laboratoire et qui a été utilisé au cours de cette thèse est décrit ici.



### I.5.2 - Mascot®

L'algorithme de recherche Mascot® est développé par Matrix Science® et a fait l'objet d'une publication en 1999 par Perkins *et al.*. Ce logiciel est extrêmement populaire notamment du fait de sa compatibilité avec les formats de données de tous les instruments de spectrométrie de masse, quel que soit leur fournisseur. Une version en ligne est disponible, restreinte au niveau du nombre de spectres MS/MS qu'il est possible d'envoyer. Lors de la recherche, Mascot® sélectionne de manière itérative des sous-groupes des ions les plus intenses du spectre, cherchant le sous-groupe qui permet de différencier et de choisir le plus clairement le score le plus haut pour le peptide correspondant. Les différentes séries d'ions (y ou b par exemple) et les états de charge considérés dans la procédure de correspondance sont testés indépendamment et en combinaison. Ainsi seules les séries d'ions contenant un nombre significatif d'ions fragments correspondants dans le spectre sont utilisées pour le score et testées indépendamment et en combinaison pour déterminer le plus haut score atteignable par le peptide. Lorsqu'il y a trop de séries d'ions, le score n'est pas affecté, mais cela réduit la spécificité (Kapp & Schutz, 2007). D'autre part, la recherche d'un spectre particulier peut s'effectuer en supposant différents états de charge du précurseur et des fragments : cela est particulièrement intéressant dans le cas de données de faible résolution. Au final seul l'état de charge donnant le plus haut score est conservé ce qui permet de ne pas affecter les statistiques de la recherche et de ne pas contribuer à augmenter les faux positifs.

Pour chaque peptide correspondant à un spectre, une probabilité basée sur le score MOWSE (Pappin, Hojrup & Bleasby, 1993) est retournée et convertie en score (Ions score =  $-10\log_{10}P$ ). Pour chaque spectre, deux scores supplémentaires sont indiqués et permettent d'évaluer les données : le seuil d'identité et le seuil d'homologie généralement plus faible. Le seuil d'identité est calculé en se basant sur le nombre d'ions précurseurs qui peuvent correspondre et au taux d'erreur spécifié par l'utilisateur (0,05 par défaut) : seuil d'identité =  $10\log_{10}(\text{taux d'erreur} / \text{précurseurs correspondant})$ . Ce seuil ne dépend donc pas de la qualité des spectres mais seulement de la tolérance MS (**Figure 76**). En revanche, le seuil d'homologie est directement lié à la qualité du spectre. Il est basé sur la distribution des scores peptidiques pour un spectre particulier. Pour un spectre médiocre ou aucun peptide possible ne dépasse le seuil d'identité, ce seuil permet de valider tout de même le peptide de plus haut score en montrant qu'il se distingue des autres peptides possibles.



**Figure 76 : Significativité du seuil d'homologie.** Le score du peptide marqué par une flèche se distingue de la distribution de scores des autres peptides. Source : <http://matrixscience.com>

## Annexe 2 : Classification et nomenclature des enzymes

### I.6 - Recommandations

Classification simplifiée extraite et adaptée de *Enzyme Nomenclature* (1992, Academic Press, San Diego, California) et basée sur les recommandations de the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB)

Le NC-IUBMB a défini des recommandations pour la classification et la dénomination des enzymes. Le premier principe de ces «recommandations» définit que le **nom d'une enzyme se termine toujours par-ase**. Ce nom doit être spécifique et unique, il sera utilisé pour une seule entité catalytique. Le second principe prescrit que les enzymes sont principalement **classées et nommées en fonction de la réaction qu'elles catalysent**. La réaction chimique catalysée étant une propriété spécifique qui distingue une enzyme d'une autre, elle sert de base au classement des enzymes. Le troisième principe retenu est que la classification des **sous-groupes d'enzyme repose sur le nom(s) du substrat(s) catalysé(s)**.

### I.7 - EC numbers

La première commission de classification des enzymes, dans son rapport de 1961, a conçu un système de nomenclature par codes numériques. Ces codes ou clés, sont précédés de la mention EC (*Enzyme classification*), et contiennent quatre numéros séparés par des points, attribués avec la signification suivante:

- ☞ Le premier chiffre correspond à l'appartenance de l'enzyme à l'une des six principales classes d'enzymes (oxydoréductases, transférases, hydrolases, lyases, isomérases et ligases).
- ☞ Le second chiffre indique la sous-classe de réaction qu'elle catalyse.
- ☞ Le troisième chiffre donne la sous-sous-classe de réaction qu'elle catalyse.
- ☞ Le quatrième chiffre est le numéro de série de l'enzyme dans sa sous-sous-classe.

## **I.8 - Les 6 grandes classes d'enzymes**

### *a) Première classe: les Oxydoréductases*

Toutes les enzymes catalysant des réactions d'oxydoréduction appartiennent à cette catégorie. Le substrat oxydé est considéré comme le donneur d'hydrogène. Le nom systématique est basé sur les couples d'oxydoréduction (donneur et accepteur). Le nom recommandé, chaque fois que cela est possible, est déshydrogénase, réductase peut être utilisé comme une alternative, le nom oxydase est utilisé uniquement dans les cas où l'O<sub>2</sub> est l'accepteur.

Le seconde chiffre dans le code des oxydoréductases indique le groupe de donneur d'hydrogène qui subit l'oxydation, ainsi le 1 désigne un groupe donneur de type CH-OH, le 2 un groupe aldéhyde ou cétone, et ainsi de suite.

Le troisième chiffre indique le type d'accepteur concerné: 1 désigne NAD(P), 2 un cytochrome, 3 l'oxygène moléculaire, 4 un disulfure, 5 une quinone ou composés similaires, 6 un groupement azoté, 7 un centre fer-soufre et 8 une flavine.

### *b) Deuxième classe : les Transférases*

Les transférases sont des enzymes qui transfèrent un groupement chimique, par exemple un groupement méthyle ou glycosyl, d'un composé donneur à un accepteur. Dans de nombreux cas, le donneur est un cofacteur (coenzyme) chargé du groupement à transférer. Certaines réactions impliquant des transférases peuvent être lues de différentes façons. Par exemple, la réaction enzymatique catalysée par  $X-Y + Z = X + Z-Y$  peut être considérée soit comme un transfert du groupe Y de X à Z, ou comme une rupture de la liaison XY par l'introduction de Z, il est préférable de considérer alors simplement Y comme une transférase. Les noms systématiques sont formés du nom du groupement transféré-transférase.

Le second chiffre dans le code des transférases indique le groupement transféré, ainsi le 1 désigne un groupement carbone, 2 un groupement aldéhyde ou cétone, 3 un groupement acétyle et ainsi de suite. Le troisième chiffre donne de plus amples informations sur le groupement transféré, par exemple la sous-classe EC 2.1 est subdivisée en méthyltransférases (EE 2.1.1), hydroxyméthyl et formyltransférases (EC 2.1.2) ...

*c) Troisième classe : les Hydrolases*

Ces enzymes catalysent l'hydrolyse des liaisons C-O, C-N, C-C et des liaisons phosphate anhydride. Bien que le nom systématique comprenne toujours hydrolase, dans de nombreux cas, ces enzymes peuvent porter le nom du substrat suivi du suffixe-ase.

Un certain nombre d'hydrolases agissent sur les liaisons ester, glycosyl, peptidique, amide ou autres. Elles peuvent permettre non seulement l'élimination d'un groupement chimique particulier de leurs substrats, mais également le transfert de ce groupement vers un accepteur approprié. En principe, toutes les enzymes hydrolytiques peuvent être classés parmi les transférases, mais l'hydrolyse est considérée comme un transfert particulier puisque l'accepteur est toujours l'eau. Dans la plupart des cas, la réaction avec l'eau comme accepteur a été découverte en premier et est considérée comme la principale fonction physiologique de l'enzyme. C'est pourquoi ces enzymes sont classées comme hydrolases plutôt que comme des transférases.

Le second chiffre dans le code des hydrolases indique la nature de la liaison hydrolysée, EC3.1 correspond aux estérases; EC3.2 aux les glycosidases, et ainsi de suite. Le troisième chiffre indique normalement la nature du substrat, par exemple parmi les glycosydases, les hydrolases spécifiques des liaisons O-glycosidiques (EC 3.2.1), ou des liaisons N-glycosydiques (EC 3.2.2), etc. Exceptionnellement, dans le cas des peptidases, le troisième chiffre est basé sur le mécanisme catalytique comme le centre actif ou le groupement prosthétique<sup>33</sup>.

*d) Quatrième classe : les Lyases*

Les lyases sont des enzymes qui catalysent la rupture de différentes liaisons chimiques par des moyens autres que l'hydrolyse ou l'oxydation, éliminant ou formant ainsi souvent de nouvelles liaisons doubles ou cycles. Par exemple, l'AMPcyclase est une lyase catalysant la réaction de transformation de l'adénosine triphosphate (ATP) en adénosine monophosphate cyclique (AMPc) :  $ATP \rightarrow AMPc + PPi$ .

Les lyases diffèrent des autres enzymes, en ce sens qu'elles ne nécessitent qu'un réactif dans le sens direct de la réaction, mais deux dans le sens inverse: Réaction:  $A \leftrightarrow B + C$ . Dans les cas où la réaction inverse est thermodynamique plus favorable, ou la seule prouvée, le nom synthase (et non synthétase) peut être utilisé.

---

<sup>33</sup> Le groupement prosthétique est une **molécule organique non protéique** ou apoprotéine maintenue dans une structure protéique au moyen de liaisons covalentes permanentes, mais aussi éventuellement des liaisons faibles (ex: liaisons ioniques, liaisons hydrogènes). Exemple : heme, FAD (flavine adénine dinucléotide), cytochrome ...

Le nom systématique des lyases est formé du motif « groupement substrat-lyase ». Le trait d'union est une partie importante de ce nom, et pour éviter toute confusion ne doit pas être omis, par exemple hydro-lyase et non pas «hydrolyase ». On retrouve ainsi parmi les grandes sous-classes de lyases des décarboxylases, des aldolases, et des déshydratases (éliminant un groupement CO<sub>2</sub>, aldéhyde, ou de l'eau respectivement).

Le second chiffre dans le code des lyases indique la nature de la liaison clivée, ainsi le 1 désigne les lyases spécifiques des liaisons carbone-carbone, le 2 celles des liaisons carbone-oxygène, le 3 carbone-azote et ainsi de suite. Le troisième chiffre donne de plus amples informations sur le groupement éliminé (EC4.1.1 le CO<sub>2</sub>, EC 4.2.1 l'H<sub>2</sub>O).

*e) Cinquième classe : les Isomérases*

Les isomérases catalysent des changements structuraux au sein d'une molécule. Il s'agit souvent de réarrangement des groupements fonctionnels et de conversion de la molécule en l'un de ces isomères suivant le modèle réactionnel  $A \rightarrow B$ . Selon le type d'isomérisation, les isomérases sont appelées racémases, épimérases, cis-trans-isomérases, tautomérases, mutases ou cycloisomérases.

Dans certains cas, la conversion du substrat est provoquée par une oxydo-réduction intramoléculaire (EC 5.3); aucun produit oxydé n'apparaît puisque le donneur et l'accepteur sont la même molécule (le substrat). Ces réactions enzymatiques ne sont donc pas classées parmi les oxydoréductases, même si elles peuvent contenir du NAD(P). Les sous-classes sont formées en fonction du type d'isomérisation, les sous-sous-classes selon le type de substrats.

*f) Sixième classe : les Ligases*

Les ligases sont des enzymes catalysant la jonction de deux molécules (en anglais *ligation*) par de nouvelles liaisons covalentes couplées à l'hydrolyse concomitante d'une molécule d'ATP ou d'autres molécules similaires de types nucléotides triphosphatés (GTP, CTP, TTP et UTP). Les noms systématiques sont formés sur le système X-ligase (ADP-ligase), le terme synthétase est parfois utilisé.



## Annexe 3: Review

1650

DOI 10.1002/pmic.201000645

Proteomics 2011, 11, 1650–1663

## REVIEW

## Investigating the plant response to cadmium exposure by proteomic and metabolomic approaches

Florent Villiers<sup>1,2,3,4\*</sup>, Céline Ducruix<sup>5\*</sup>, Véronique Hugouvieux<sup>1,2,3,4</sup>, Nolwenn Jarno<sup>1,2,3,4</sup>, Eric Ezar<sup>5</sup>, Jérôme Garin<sup>2,6,7</sup>, Christophe Junot<sup>5</sup> and Jacques Bourguignon<sup>1,2,3,4</sup>

<sup>1</sup> Commissariat à l'Energie Atomique (CEA), Direction des Sciences du Vivant (DSV), Institut de Recherches en Technologies et Sciences pour le Vivant (IRTSV), Laboratoire de Physiologie Cellulaire Végétale (LPCV), Grenoble, France

<sup>2</sup> Université Joseph Fourier (UJF), Grenoble, France

<sup>3</sup> CNRS (UMR), LPCV, Grenoble, France

<sup>4</sup> INRA (UMR), LPCV, Grenoble, France

<sup>5</sup> CEA, Institut de Biologie et de Technologies de Saclay (IBITEC-S), Laboratoire d'Etude du Métabolisme des Médicaments, CEA-Saclay, France

<sup>6</sup> CEA, DSV, IRTSV, Laboratoire d'Etude de la Dynamique des Protéomes, Grenoble, France

<sup>7</sup> INSERM, Grenoble, France

Monitoring molecular dynamics of an organism upon stress is probably the best approach to decipher physiological mechanisms involved in the stress response. Quantitative analysis of proteins and metabolites is able to provide accurate information about molecular changes allowing the establishment of a range of more or less specific mechanisms, leading to the identification of major players in the considered pathways. Such tools have been successfully used to analyze the plant response to cadmium (Cd), a major pollutant capable of causing severe health issues as it accumulates in the food chain. We present a summary of proteomics and metabolomics works that contributed to a better understanding of the molecular aspects involved in the plant response to Cd. This work allowed us to provide a finer picture of general signaling, regulatory and metabolic pathways that appeared to be affected upon Cd stress. In particular, we conclude on the advantage of employing different approaches of global proteome- and metabolome-wide techniques, combined with more targeted analysis to answer molecular questions and unravel biological networks. Finally, we propose possible directions and methodologies for future perspectives in this field, as many aspects of the plant-Cd interaction remain to be discovered.

Received: October 15, 2010

Revised: January 25, 2011

Accepted: February 1, 2011

### Keywords:

Cadmium / 2-DE / Metabolomics / MS / Plant proteomics

### 1 Introduction

Contamination of soil and water by heavy metals represents a major environmental hazard to human health. Among these

pollutants, cadmium (Cd) is a highly toxic metal released into the environment by mining and industrial activities, land applications of sewage sludge, use of phosphorus fertilizers and atmospheric deposition [1]. It is considered as a non-essential metal, although it has been identified as a cofactor in a marine diatom [2]. Over the last 15 years, Cd<sup>2+</sup> has been permanently listed as No 7 (out of 275) in the priority list of hazardous materials by the Comprehensive Environmental Response, Compensation, and Liability Act (CERCLA) [3], while the world consumption of Cd<sup>2+</sup> by industries has increased from 18 400 tons in 2003 to 20 400 tons in 2007. Surprisingly, the mechanistic basis of its toxicity is still poorly

**Correspondence:** Dr. Jacques Bourguignon, LPCV, IRTSV, CEA, UJF, CNRS (UMR 5168), INRA (UMR1200), 17 rue des Martyrs, 38054 Grenoble Cedex 9, France  
E-mail: jacques.bourguignon@cea.fr  
Fax: +33-438-78-50-91

**Abbreviations:** CAX, cation exchanger; MetSO, methionine sulfoxide; NRAMP, natural resistance-associated macrophage protein; PR, pathogenesis-related; PTM, post-translational modifications; TCA, tricarboxylic acid; Ub, ubiquitin

\*These authors contributed equally to this work.



understood. Because  $\text{Cd}^{2+}$  is a class B metal, it has a high affinity with sulfur ligands and one part of its toxicity can be explained through its strong interaction with sulfhydryl groups in proteins, and  $\text{Cd}^{2+}$  may also interfere with homeostasis of several essential metals including  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+/2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  and  $\text{Cu}^{2+}$ . Evidence of these possible molecular targets has been provided in vitro but the demonstration of in vivo occurrences of such processes is scarce [4]. In plants,  $\text{Cd}^{2+}$  toxicity is associated with a number of morphological, physiological and biochemical defects such as alteration of photosynthetic processes or enzyme inhibitions leading to growth inhibition and chlorosis [1, 5].  $\text{Cd}^{2+}$  is easily taken up by plant roots via  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  and  $\text{Ca}^{2+}$  transporters [6]. Inside the plant, different processes contribute to enhance Cd tolerance including extracellular immobilization (cell wall and other carbohydrates), active exclusion into the apoplast, chelation in the cytosol and sequestration into the vacuoles [1, 5, 7–10]. Increasing the intracellular binding capacity of the plants or the expression of specific transporters, for example, greatly influences the accumulation and distribution of heavy metals in plants. Therefore, a better comprehension of the molecular mechanisms controlling these processes, as well as understanding metal toxicity and accumulation in plants, is of prime importance towards phytoremediation via engineered plants or natural hyperaccumulators [11] but also for phyto-mining and food crop biofortification. This is also important for the selection of crops with low heavy metal contents, or from an ecotoxicological point of view, for example to identify biomarkers of pollution. The recent development of global approaches such as proteomics and metabolomics opens possibilities for a deeper exploration of the cellular regulation and adaptation mechanisms. During the last decade, several studies have used proteomic approach to gain a better understanding of events occurring in plants during heavy metal stresses and a complete overview of these studies has been reported recently [12]. In this review, we will focus on the analysis of the plant response to Cd stress explored by proteomic and metabolomic approaches. We will particularly emphasize how these techniques are powerful to highlight molecular mechanisms and metabolic/signaling pathways implicated in the plant defense strategy against Cd and point out those impeded by this toxic chemical.

## 2 Quantitative proteomic techniques and strategies employed to analyze the impact of cadmium stress on protein accumulation

High-throughput approaches such as global proteomics analysis are powerful tools to simultaneously monitor the presence, in a qualitative or quantitative manner, of hundreds of different proteins in a sample. The resolution of this analysis, however, is limited by the high complexity of the sample, often leading to the repeated detection of the same major components while less represented ones remain

“hidden.” One way to circumvent this issue is to perform a prefractionation of the protein sample, typically by 1-D or, more often, 2-DE prior to protein identification by mass spectrometry (MS). Despite the fact that gel-based proteomic strategies are being supplanted by in-solution protein digestion followed by nanoLC-based peptide fractionation, a large part of the proteomic work on plants have used, and still uses, this 2-DE/mass identification combination [13–17]. These reference maps represent “snapshots” of the protein sets present in a cell or a tissue at a given time and at a particular developmental stage, and constitute a basis to further explore the proteome dynamics. Table 1 reports the quantitative 2-DE-based proteomic studies performed to analyze proteome changes in response to Cd in several tissues. Some examples using gel-free proteomic technology are also mentioned.

Roots are usually more exposed (containing up to 80–90% of the total Cd content in *Arabidopsis* [18, 19]) and have therefore been extensively studied for their cellular response to Cd through proteomic investigations in *Arabidopsis thaliana* [20, 21], *Populus tremula* [22], *Brassica juncea* [23], *Oryza sativa* L. [24, 25] and *Lycopersicon esculentum* [26]. The impact of Cd on leaves, cell cultures or other tissues was also analyzed in *Populus* [22, 27–30], *O. sativa* L. [25, 31, 32], *A. thaliana* [21, 33], *Glycine max.* L. [34], *Thlaspi caerulescens* [35], *Lepidium sativum* L. [36], *Spinacia oleracea* [37], *Linum usitatissimum* L. [38] and *L. esculentum* [26]. As both  $\text{Cd}^{2+}$  bioavailability and global plant response can be modulated by soil microorganisms, some studies have also investigated the role of symbiotic relationship between arbuscular mycorrhizal fungi and legume plants such as *Pisum sativum* [39] and *Medicago truncatula* [40]. Similarly, proteomics analysis of the  $\text{Cd}^{2+}$  (associated with  $\text{Zn}^{2+}$ ) response was carried out on *Arabidopsis halleri* in the presence of rhizosphere microorganisms [41]. Most of these proteomic works were performed on plants cultured in hydroponic conditions, with exposure times varying from a few hours to 61 days and using Cd concentrations ranging from 0.1  $\mu\text{M}$  to 1 mM (Table 1). Nevertheless, as valuable as these studies are, the need for both a deeper dissection of the proteome dynamics and a subcellular level of this characterization led to several analyses of purified organelles rather than whole tissues, as already performed for environmental stresses, developmental stages or plant tissues [42–47], which represents an invaluable tool for a complete understanding of plant functions, as well as biosynthetic and signaling pathways [48].

## 3 Toward an overview of the plant response to cadmium stress

### 3.1 Photosynthesis: Achilles' heel of Cd-challenged plants

The consequences of Cd stress on plants using proteome-wide approaches were first described by Hajdúch et al. [31]



**Table 1.** A summary of proteomic investigations in order to analyze the plant response to cadmium (Cd) exposure, published in the period 2001–2010, at tissue or cellular proteome (A) or subcellular level (B)

Plant Species	Plant materials (age) <sup>a)</sup>	Proteomic technologies	[Cd]; exposition time	Growth and treatment conditions (plants/vol) <sup>b)</sup>	Ref.
<b>A – global proteome: analyses carried out on a total extract from the cited plant materials</b>					
<b>Arabidopsis</b>					
<i>A. thaliana</i>	Cultured cells	2-DE, MALDI-TOF MS, LC-ESI-MS/MS	0.5, 2, 5, 20, 50 and 200 $\mu$ M CdCl <sub>2</sub> ; 24 h	Cell culture (7–9 g/100 mL)	[33]
<i>A. thaliana</i>	Roots (6 wk)	2-DE, MALDI-TOF MS	10 $\mu$ M; 24 h	Hydroponic (NC)	[20]
<i>A. thaliana</i>	Leaves (3 wk)	2-DE, LC-ESI-MS/MS	1 and 10 $\mu$ M; 1 wk	Semi-hydroponic (on rockwool) (NC)	[21]
<b>Poplar</b>					
<i>P. tremula</i>	Leaves (15 wk)	2-D DIGE, MALDI-MS/MS	20 $\mu$ M; 14 days	Hydroponic (2 plants/5 L)	[27]
<i>P. tremula</i>	Roots (15 wk)	2-D DIGE, MALDI-MS/MS	20 $\mu$ M; 3, 7, 14, 28 and 56 days	Hydroponic (2 plants/5 L)	[28]
<i>P. tremula</i>	Leaves (15 wk)	2-D DIGE, MALDI-MS/MS	20 $\mu$ M; 3, 7, 14, 28 and 56 days	Hydroponic (2 plants/5 L)	[22]
<i>P. tremula</i>	Leaves (size with 22–24 leaves)	2-D DIGE, MALDI-MS/MS	20 $\mu$ M; 14, 28 and 56 days	Hydroponic (NC)	[22]
<i>P. tremula</i> X <i>Populus alba</i> (717-1B4 genotype)	Leaves (3 months)	2-D DIGE, MALDI-MS, MALDI-MS/MS	360 mg/kg DW soil; 61 days	Soil (10 L pot)	[29]
<i>P. nigra</i> spp. Clone (Poli)	Leaves ( $\geq$ 6 wk)	2-D LC UV, MALDI-MS/MS	50 $\mu$ M; 3 wk	Hydroponic (NC)	[30]
<b>Rice</b>					
<i>O. sativa</i> L.	Leaves (before heading stage)	2-DE, Edman degradation	250 $\mu$ M; 72 h	Leaf segments floated on Cd solution	[31]
<i>O. sativa</i> L.	Roots (3 days)	2-DE, MALDI-MS/MS	0.1, 1, 10, 100 & 1000 $\mu$ M; 2 wk	Solid MS medium supplemented with Cd	[24]
<i>O. sativa</i> L.	Germinating seedlings	2-DE, MALDI-TOF MS	800 $\mu$ M; 4 days	Thirty seeds on filter paper with 10 mL of Cd solution	[32]
<i>O. sativa</i> L.	Leaves (10 days)	2-DE, MALDI-TOF MS	100 $\mu$ M; 24 h	Hydroponic (NC)	[25]
<i>O. sativa</i> L.	Roots (10 days)	2-DE, MALDI-TOF MS	100 $\mu$ M; 24 h	Hydroponic (NC)	[25]
<b>Others</b>					
<i>G. max</i> L.	Cultured cells	[35S]-methionine labeling, 1-D SDS-PAGE, LC-MS, LC-ESI-MS/MS	3, 5, 6 and 10 $\mu$ M; 24, 48 and 72 h	Cell culture (NC)	[34]
<i>T. caerulea</i> (3 accessions): <i>La Calamine</i> , <i>Lellingen</i> , <i>Monte Prinzer</i>	Roots (12 wk)	2-DE, LC-ESI-MS/MS	60 $\mu$ M CdSO <sub>4</sub> ; 1 wk	Hydroponic (6 L)	[35]
<i>Lepidium sativum</i> L.	Germinating seedlings	2-DE, LC-ESI-MS/MS	1.1 mM CdCl <sub>2</sub> ; 72 h	Ten seeds on filter paper with 5 mL of Cd solution	[36]
<i>A. halleri</i> (+/– rhizosphere microorganisms)	Shoots; 30 days	2-DE, LC-ESI-MS/MS	1 mM CdSO <sub>4</sub> + 10 mM ZnSO <sub>4</sub> ; 1 month	Semi-hydroponic (on perlite) (11 pot)	[41]
<i>M. truncatula</i>	Roots; 3 days	2-DE, LC-ESI-MS/MS	2 mg/kg of soil; 3 wk	Soil (neutral clay loam/sand; 1:2 v/v) (0.4 L pot)	[40]
<i>Spinacia oleracea</i>	Basal and apical leaves; 20 days	2-DE, LC-ESI-MS/MS	100 $\mu$ M CdX (NC); 5 and 8 days	Hydroponic (0.9 L pot)	[37]
<i>B. juncea</i>	Roots; 13 days	2-DE, LC-ESI-MS/MS	250 $\mu$ M CdCl <sub>2</sub> ; 3 days	Hydroponic (NC)	[23]
<i>L. usitatissimum</i> L.	Cultured cells	2-DE, MALDI-MS/MS	10, 50 and 100 Cd(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ; 2, 8, 24 and 48 h	Cell culture (10 g/50 mL)	[38]
<i>L. esculentum</i>	Roots; 4 wk	2-DE, MALDI-TOF-MS, LIFT MS/MS	10 and 100 $\mu$ M CdCl <sub>2</sub> ; 10 days	Hydroponic (18 plants/10 L pot)	[26]

Table 1. Continued

Plant species	Plant materials (age) <sup>a)</sup> /subcellular compartment	Proteomic technologies	[Cd] used in $\mu$ M/time of exposure	Growth and treatment conditions (plants/vol) <sup>b)</sup>	Ref.
<b>B – subcellular compartment proteomic analyses</b>					
<i>A. thaliana</i>	Roots (6 wk)/GSH-binding proteins	Affinity column (GSH-Sepharose)/2-DE, MALDI-TOF MS,	10 $\mu$ M/24 h	Hydroponic (NC)	[20]
<i>A. thaliana</i>	Cultured cells/plasma membrane	<sup>15</sup> N metabolic labeling, 1-D SDS-PAGE, LC-MS/MS	100 $\mu$ M/24 h	Cell culture (NC)	[109]
<i>Hordeum vulgare</i> L.	Primary leaves (4 days)/tonoplast	iTRAQ, LC-ESI-MS/MS	20 and 200 $\mu$ M; 6 days	In vermiculite (NC)	[98]
<i>B. juncea</i>	Roots (13 days)	iTRAQ, LC-ESI-MS/MS	250 $\mu$ M CdCl <sub>2</sub> ; 3 days	Hydroponic (NC)	[23]
<i>S. oleracea</i> L.	Basal leaves (20 days)/thylakoids	1- & 2-D BN-PAGE, LC-ESI-MS/MS	100 $\mu$ M; 5, 10 and 15 days	Hydroponic (NC)	[49]

a) Age of the plants when treated.

b) Number of plants (or gram of cultured cells)/volume of culture; NC: non-communicated.

on rice leaf, who observed drastic changes at the RuBisCO level due to both lower expression and fragmentation of this Calvin cycle enzyme. Other works [27, 29, 37] confirmed the harmful effect of Cd on the chloroplast and on the photosynthetic machinery, reporting a down-regulation of enzymes involved in the Calvin cycle and in the electron transfer chain (Cyt B6-f complex iron-sulfur subunit, chloroplast ferredoxin-NADP<sup>+</sup> oxidoreductase, oxygen-evolving enhancer proteins 1 and 2) (Fig. 1, Photosynthesis, primary target of Cd). Cd-induced changes in the structure and organization of the photosynthetic apparatus were further studied from thylakoid membrane proteins submitted to a comparative proteomic analysis after fractionation by 1-D Blue Native (BN)-PAGE, 2-D BN-SDS-PAGE or by ultracentrifugation on sucrose density gradient [49] (Fig. 1, Table 1). The authors showed that Cd provoked a disorganization of PSI, which was correlated with the diminution of chlorophyll a and b contents and a significant reduction of antenna proteins of this photosystem, whereas the structure of the PSII was less affected and no changes were observed on the cytochrome *b6/f* and ATP-synthase complex organization. Interestingly, however, when *A. thaliana* was exposed to low, environmentally realistic, Cd concentrations (1  $\mu$ M), plants succeeded in adapting their metabolism to cope with Cd. RuBisCO protein level was found unchanged while severe stress, as judged by growth reduction and chlorosis at the macroscopic level and by lipid peroxidation at the cellular one, led to an increase in the protein abundance [21]. This decreased effect of Cd over time was also mentioned from study on poplar [28], suggesting a global ability of plants to setup protection mechanisms in order to lower Cd effect and to survive upon heavy metal stress.

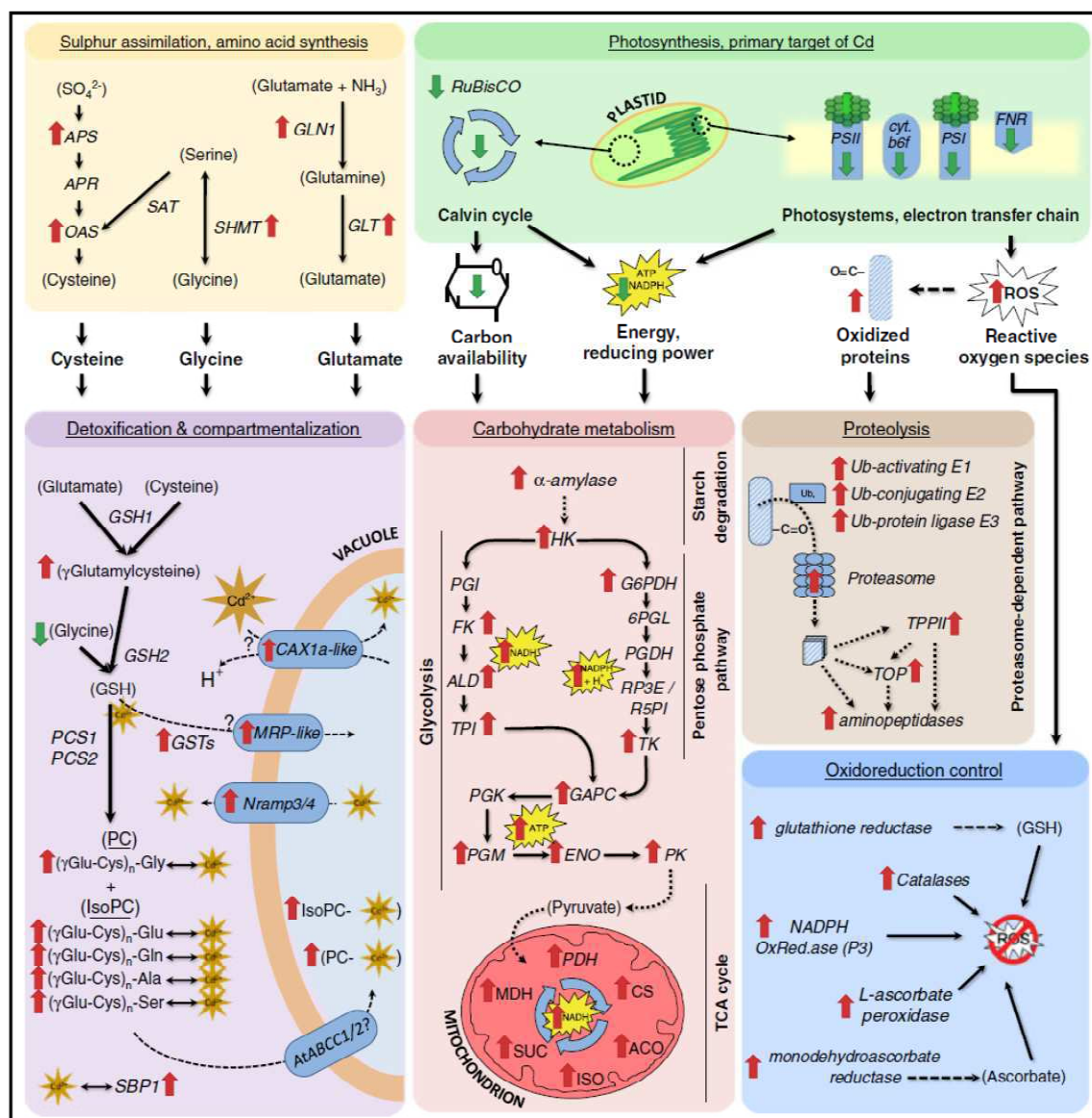
### 3.2 Limiting the damages: Changes in carbohydrate metabolism and response to the oxidative stress

The Cd-induced disorganization of the photosynthetic apparatus has an important impact on the plant's ability to withstand the stress through two major causes: (i) a limited availability of reducing power and of carbon sources and (ii) an oxidative burst resulting, at least in part, from the disruption of the electron transfer chain [29].

#### 3.2.1 Carbohydrate metabolism

Affecting the photosynthetic metabolism by Cd creates need for the plant to remobilize energy and reductive power from other metabolic pathways (glycolysis, tricarboxylic acid (TCA) cycle, etc.). Kieffer et al. [27] showed in poplar leaves that an  $\alpha$ -amylase (starch degradation) and a fructose kinase 2 (phosphorylation of fructose prior to glycolysis) were up-regulated. Other proteomic works showed that enzymes of the glycolysis such as hexose kinase (HK), fructose-bisphosphate aldolase (ALD), triose phosphate isomerase (TPI), cytosolic glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPC), phosphoglycerate mutase (PGM), enolase (2-phosphoglycerate hydrolase, ENO) and pyruvate kinase (PK) were overexpressed during Cd exposure in different species [20, 22, 24–26, 28, 29, 33, 38] (Fig. 1, carbohydrate metabolism). Comparatively, enzymes of the TCA cycle were also observed to be up-regulated, including pyruvate dehydrogenase complex components (PDH E1, E2 and E3), citrate synthase (CS), aconitase (ACO), NADP-specific isocitrate dehydrogenase (ISO), succinate dehydrogenase (SUC) or malate dehydrogenase (MDH) [21, 22, 30, 33] (Fig. 1, carbohydrate metabolism). The NADP-dependent malic enzyme linking glycolysis to the TCA cycle





**Figure 1.** Cellular functions and molecular mechanisms highlighted by proteomic and metabolomic investigations under cadmium stress. Information concerning Cd-induced modifications of main cellular functions or metabolic pathways presented here (photosynthesis; sulfur assimilation and amino acid synthesis; detoxification and compartmentalization; carbohydrate metabolism, proteolysis and oxidoreduction control) are further detailed in the text.

and the adenylate kinase, which plays an important role in cellular energy homeostasis by catalyzing the formation of an ATP from two ADPs, was also overexpressed [20, 22, 28, 33]. Enzymes of the pentose-phosphate pathway (glucose-6 phosphate dehydrogenase, transketolase) were also upregulated [22, 33] (Fig. 1, carbohydrate metabolism). Such stimulation of biosynthetic enzymes is probably necessary to increase the flux of production of ATP, NADH and NADPH in order to not only sustain the cells in terms of energy demand and

reducing molecules, but also to synthesize carbon skeletons (phosphoglycerate,  $\alpha$ -ketoglutarate) required for the synthesis of amino acids and molecules involved in Cd chelation [33].

### 3.2.2 Oxidative stress

Although  $\text{Cd}^{2+}$  is not a redox-active metal able to generate ROS via Haber–Weiss or Fenton reactions, it may induce



production of ROS by interfering with, and inhibiting, antioxidant enzymes [1, 6], or due to the disruption of the electron transfer chain. Additionally, a downregulation of several important ROS-coping enzymes, including enzymes of the ascorbate biosynthesis pathway [27], seems to contribute to a general imbalance of ROS generation/detoxification.

One of the constant effects of Cd in plants is the expression of several enzymes involved in oxidative stress defenses. A careful analysis of the proteomic-related literature revealed that the main enzymes involved in ROS detoxification that are upregulated by Cd<sup>2+</sup> are enzymes involved in peroxide detoxification (catalases, L-ascorbate peroxidase and other types of peroxidases [23, 25, 27, 33]) as well as enzymes involved in the ascorbate-glutathione cycle (monodehydroascorbate reductase [23, 33], glutathione reductase [25]) (Fig. 1, oxidoreduction control). It is interesting to note that Fe-superoxide dismutase (SOD) seems to be upregulated by Cd<sup>2+</sup> [21, 28], whereas Cu/Zn SOD are downregulated [23, 27, 28]. Some peroxiredoxins were also found to be upregulated [29, 32, 33]. These thiol peroxidase enzymes detoxify various peroxide substrates by intra- or inter-molecular thiol-disulfide-reactions via a cysteinyl residue, subsequently reduced by electron donors such as thioredoxins, glutaredoxins, ascorbate and glutathione [50, 51]. Peroxiredoxins are also involved in additional important physiological functions including enzyme activation or redox sensing [51]. Proteomic study on *Arabidopsis* cell cultures highlighted the upregulation by Cd of an NADPH oxidoreductase called P3 [33], whose overexpression in yeast, similarly for its homologue P1, improves the survival of cells deficient in Yap1 function (transcription factor, sensor of the cellular redox state) in the presence of the thiol-oxidizing drug diamide [52].

ROS are known to alter proteins by provoking oxidation of both protein backbone and amino acid side chain residues. Sulfur-containing residues, Met and Cys, are with Trp, Tyr and His, the most susceptible to oxidative damage due to their high reactivity with ROS [53]. Methionine may be oxidized in methionine sulfoxide (MetSO) and it was reported that Cd-treated *B. juncea* is able to induce a MetSO reductase [23], which convert MetSO back into Met [54] using glutaredoxin or thioredoxin [55, 56]. Interestingly, a mutant of *Escherichia coli* deficient in MetSO exhibits increased sensitivity to Cd [57]. Apart from the reactions involving sulfur-containing amino acids, carbonylation is the most common oxidative protein modification [58] and it was reported that Cd promoted carbonylation of proteins [59]. These post-translational modifications (PTM) seem to be irreversible and oxidized proteins have to be degraded notably by the proteasome [60–63]. Numerous Cd-related proteomic works reported the induction of several proteolysis-related proteins, such as subunits of 20S and 26S proteasomes, ubiquitin (Ub) family proteins, Ub-activating enzyme E1, Ub-conjugating enzyme E2, Ub-protein ligase E3, a subtilase (serine-type endopeptidase), aspartyl protease family protein and cytosol aminopeptidase [20, 21, 23–27, 32, 33] (Fig. 1, proteolysis). Using biochemical and

proteomic approaches, the proteasome-dependant proteolytic pathway, which includes the 20S proteasome and other peptidases acting downstream to it (tripeptidyl-peptidase II, thimet oligopeptidase, leucine aminopeptidase), was recently investigated in *Arabidopsis*, and its activation in response to Cd was demonstrated [64] (Fig. 1, proteolysis). Gene expression and proteolytic activity of the proteasome complex and the other peptidases were found to be upregulated. In vitro assay also showed that oxidized proteins were preferentially degraded by the *Arabidopsis* 20S proteasome pathway [64]. Together with additional references [65, 66], these results suggest that degradation of oxidized (carbonylated) proteins by the proteasome pathway is likely to play an important role in the resistance against Cd toxicity.

Several other enzymes involved in oxidative stress defense were shown to be upregulated by Cd. This includes phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase [33], aldehyde dehydrogenases [28, 33], formate dehydrogenase [29, 33, 38], glyoxalase I [32], 2-nitropropane dioxygenase [20, 23], several quinone or other oxidoreductases [21, 27, 28, 30, 33]. Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidases are considered as the main enzymatic defense against oxidative destruction of membranes, and are probably required to cope with lipid peroxides induced by Cd<sup>2+</sup>-mediated oxidative stress. Such lipid peroxidation, measured using thiobarbituric acid reactive compounds [21, 32] may provoke the production of toxic aldehydes. These are most probably at the origin of the induction of aldehyde dehydrogenases (required for aldehyde and acetaldehyde detoxification [27, 28, 33]). The induction of glyoxalase I is certainly involved in detoxification of methylglyoxal produced from triose-phosphates (glyceraldehyde-3-phosphate, dihydroxyacetone phosphate) accumulation during upregulation of glycolysis upon stress conditions. Formate dehydrogenase is probably necessary to cope with an overproduction of formaldehyde [67, 68], and 2-nitropropane dioxygenase (nitronate monooxygenase) is involved in the dinitrification of nitro compounds [69] that also seems to accumulate during Cd stress [23].

Interestingly, a copper chaperone (AtCCH) [21, 33] that belongs to a family of small Cu<sup>+</sup>-binding proteins required for Cu homeostasis was also shown to be upregulated. Similarly, AtATX1, AtCCH is able to carry and transfer Cu to the yeast Ccc2 P-type ATPase in the secretory pathway and confers antioxidant protection [70]. The CCH-type Cu chaperones are thought to mediate a plant-specific function such as Cu transport through the plasmodesmata and therefore, Cu mobilization during senescence [70] or maybe during degradation of Cu-containing metalloenzymes provoked by Cd stress.

### 3.2.3 Other Stress-related proteins

HSPs, and more generally molecular chaperones, are involved in diverse processes including protein (re)folding



and stabilization under stress conditions [71, 72], and are known to be induced by a wide variety of stresses, including Cd treatment (HSP70, DnaK subfamily proteins and HSP60 [26, 28, 32, 33, 38]). Protein disulfide isomerases, also involved in protein folding, are also upregulated upon Cd stress [28, 33]. In some cases however, HSPs and chaperonins were shown to be downregulated [23, 27–29].

Glutathione S-transferases (GST) mediate the conjugation of endogenous and xenobiotic compounds with glutathione (GSH) [73, 74], transported into the vacuole via a family of GS-X pumps located in the tonoplast [75]. Seven classes of GST are present in plant, including the two plant-specific  $\tau$ - (GSTU) and  $\phi$ - (GSTF) families, involved in these conjugating activities. Other classes have various functions including glutathione peroxidase ( $\xi$  class), glutathione-dependent isomerase ( $\zeta$  class) and dehydroascorbate reductase [76] activities. Among the 47 GST present in *Arabidopsis* [77], numerous proteomic works identified members of the  $\phi$  and  $\tau$  subfamilies as upregulated by Cd exposure (AtGSTF2, 6 and 7 [20], AtGSTs: AtGSTF10 and AtGSTU8, 19 and 28, and AtGSTF9 [21]). AtGSTF6 is quickly and strongly induced by several stresses [77], whereas AtGSTF2 showed a more selective induction response and is strongly induced by ethylene [77, 78]. This induction of several GSTs by Cd is also described in soybean [34] and poplar [27, 28], and correlated with an important increase in their activity [28] or transcript level [25] (Fig. 1, compartmentalization). Interestingly, GSTs were also shown to be involved in the direct conjugation of the toxic metal with glutathione in *Saccharomyces cerevisiae* [79]. A better characterization of these GST isoforms would be necessary in the future to analyze their specific function.

Several proteomic studies also revealed that some of the mechanisms involved in the plant response to a Cd stress are common with inducible defense mechanisms activated upon pathogen attack, including the production of different pathogenesis-related (PR) proteins, which can result from shared signaling pathways [80]. Among the PR proteins induced by Cd are a major latex-protein, a PR-10 family member [20] (also induced in response to salt stress and bacteria [81, 82]), a traumatin-like protein, a PR-5 family member [21, 27], class I chitinases, member of the PR-3 family and several,  $\beta$ -1,3-glucanases belonging to the PR-2 family [27].

### 3.3 Organizing the riposte: Cd neutralization and exclusion

Plant exposure to Cd enhances expression of enzymes involved in the biosynthesis of glutamate, cysteine and glycine, which are required for GSH and phytochelatin synthesis (Fig. 1, sulfur assimilation, amino acid synthesis). Glutamine synthetase (GLN1) and glutamate synthase (GLT) were shown to be induced in several Cd<sup>2+</sup>-treated

plant tissues [21, 22, 27, 28, 33], as well as an alanine aminotransferase or an aspartate aminotransferase, probably involved in the production of glutamate [20, 24, 33]. Global proteomic works have also shown that enzymes required for sulfur assimilation were upregulated by Cd exposure [18, 33, 83, 84], as well as components of the cysteine and glycine metabolic pathways (ATP sulfurylase (APS), cytosolic and mitochondrial serine hydroxymethyltransferase (SHMT), protein components of the glycine decarboxylase complex, O-acetylserine (thiol)-lyase (OAS), alanine:glyoxylate aminotransferase 2 [20, 23, 28, 33, 37]) (Fig. 1, sulfur assimilation, amino acid synthesis).  $\gamma$ -Glutamylcysteine synthetase (GSH1,  $\gamma$ -ECS), the first enzyme of the glutathione biosynthetic pathway, was also overexpressed in *Arabidopsis* cells exposed to 50 and 200  $\mu$ M Cd [33] but was also shown to remain stable, as well as GSH2 (glutathione synthetase), as observed at the transcription level [18, 85, 86]. This suggests that the quantity of these enzymes is sufficient to sustain the metabolic flux leading to the synthesis of GSH and PCs (Fig. 1, compartmentalization).

Identified from global quantitative proteomic analyses performed on *Arabidopsis* cells [33], the *Arabidopsis* homologue to the human selenium binding protein SBP1 was also shown to be induced by Cd and necessary for metal tolerance [19] (Fig. 1, compartmentalization). However, while binding studies indicated direct interactions between SBP1 and Cd, expression analysis and immunodetection assays demonstrated that SBP1 expression was actually enhanced in response to sulfur deprivation, and that SBP1 overexpression was favorable against stresses requiring GSH as tolerance factor [87].

Plant cell vacuoles are multifunctional organelles that play a key role in plant physiology. They are essential for maintaining plant cell homeostasis of various ions and metabolites and for plant adaptation to biotic and abiotic stresses, where they are involved in the sequestration of toxics. This homeostasis is ensured by active and/or passive transport across the tonoplast, and the recent work performed on *Arabidopsis* [88–92], barley [93] and cauliflower buds [94] allowed the identification of 1100 non-redundant proteins [48], including 110 transporters. Despite the fact that the vacuole is the final storage site for heavy metals, it is still unclear how Cd<sup>2+</sup> is transported into the vacuole in plants and very few candidates for this function have been identified [95, 96]. In yeast, cytosolic Cd<sup>2+</sup> is chelated by GSH (*S. cerevisiae*) or PC (*S. pombe*), and imported in the vacuole by ABC transporters (ScYCF1, [97] and SpHMT1 [98], respectively). Interestingly, two different studies showed that SpHMT1 required GSH and not PC for functioning [99, 100]. It is intriguing to notice that no vacuolar ABC transporters have ever been shown to mediate PC–Cd transport across the tonoplast, although such complexes have been localized to both cytosolic and vacuolar fractions [101]. However, the recent identification of two ABC-type transporters for their function in As–PC transport across the



tonoplast [102] opens perspectives in this matter as they might be also involved in Cd detoxification. So far, only the Cation exchanger (CAX) transporters [103, 104] and HMA3 (a P1-B ATPase) [105] have been identified for their vacuolar Cd-transport activity. In order to identify new vacuolar transporters involved in Cd detoxification, Schneider et al. [96] performed an elegant quantitative proteomic approach using iTRAQ-based stable isotope labeling technique (Table 1). Highly purified vacuoles were isolated from leaves of Cd- and mock-treated plants, and analysis of tonoplast proteins fluctuations led to the identification of six overexpressed transporters including a CAX1a-like transporter, an uncharacterized membrane protein, an MRP-like ABC transporter and a member of the natural resistance-associated macrophage protein (NRAMP) family. Interestingly, two *Arabidopsis* homologues to the later one, AtNRAMP 3 and 4, are known to be involved in iron and manganese homeostasis but also in Cd transport [106]. These NRAMP transporters were proposed to play redundant roles in the export of iron from the vacuole during seed germination [107] and are also required for Mn mobilization from the vacuole of mesophyll cells in adult plants [108].

While vacuolar transporters have been extensively studied, soluble proteins of this organelle, in contrast, have drawn less attention even though it is plausible that mechanisms following ion uptake in the vacuole and leading to its stabilization are critical for long-term storage and sequestration. Next important challenges in this field are likely to be the identification of the vacuolar actors involved in mechanisms allowing long-term protection against heavy metal, and preliminary results of 2-D DIGE experiments (Villiers and Bourguignon, unpublished data) pointed out 29 spots, out of 1481, as differentially represented in mock- versus Cd-treated samples.

In addition to Cd sequestration in the vacuole, limitation of Cd entry and exclusion by plasma membrane localized transporters greatly influences Cd tolerance of plants. A comparative proteomic study of the plasma membrane proteome, using  $^{15}\text{N}$ -metabolic labeling of *Arabidopsis* suspension cells, allowed the identification of proteins upregulated by the metal [109], including the ABC transporter AtPDR8, known as a Cd resistance factor [110], as well as an ammonium transporter (AtAMT1.1). Interestingly, it was recently reported that a low-affinity nitrate transporter, NRT1.8, is also upregulated by  $\text{Cd}^{2+}$  and plays an important role in  $\text{Cd}^{2+}$  tolerance by increasing the delivery of nitrate at the root level [111].

#### 4 Studying the plant response to cadmium by metabolic profiling

As powerful as such global quantitative proteomics approaches are, it has often been argued that protein amount in a cell does not always correlate with protein activity, and therefore metabolic fluxes. Metabolomics is an

analytical tool used in conjunction with pattern recognition approaches and bioinformatics to detect metabolites and follow their changes in biofluids, cells or tissues. It aims at identifying and quantifying virtually all the metabolites in a given organism or tissue and at assessing relationships between them. Most analytical platforms rely on MS-based and NMR technologies because they allow both metabolite detection and identification. GC coupled to electron impact time-of-flight (TOF) MS was the first approach used in large-scale plant [112], and is still the preferred method for plant metabolomics, although it is restricted to a small set of biological molecules (those that are volatile or can be derivatized), and does not provide molecular mass of intact biological molecules. Although CE-MS enables good separation and detection of many polar primary metabolites [113], it is seldom used to compared GC-TOF MS. Analysis of semi-polar metabolites is mainly performed using LC-MS with a soft ionization technique, such as electrospray ionization (ESI) or atmospheric pressure chemical ionization (APCI), allowing detection of the large group of plant secondary metabolites (alkaloids, saponins, phenolic acids, phenylpropanoids, flavonoids, glucosinolates, polyamines and derivatives thereof [114]). Approaches without prior compound separation have also been developed to compare metabolite fingerprints of crude plant extracts by taking advantage of the high mass resolution of TOF-MS and Fourier transform-ion cyclotron resonance-MS (FTMS) instruments [115, 116]. Another potentially powerful tool for plant metabolite analysis is high-resolution NMR, in particular  $^1\text{H}$  NMR combined [117] or not [118–120] with LC. It is a non-destructive, rapid and very robust technique, which produces highly informative structural information, yet requiring large amounts of samples.

Comparative metabolomics analyses of Cd-stress response have highlighted a number of metabolites involved in diverse metabolic pathways. Several studies further confirmed results obtained from proteomics approaches, such as biochemical changes related to energy production and TCA cycle (NMR-based study of *Silene cucubalus* [121]), or an increase in antioxidants compounds ( $\alpha$ -tocopherol, campesterol,  $\beta$ -sitosterol and isoflavone) [122]. The later work also mention increased levels of Ala,  $\beta$ -Ala, Pro, Ser, putrescine, Suc, 4-aminobutyric acid, glycerol, raffinose and trehalose, and a simultaneous decrease in Glu, Gln, Asp and Asn derived from  $\alpha$ -ketoglutarate and oxaloacetate. But the metabolomics viewpoint shows its potential where proteomics-based studies reach their limits. In particular, while the phytochelatin (PC) synthases seem to be constitutively expressed, and therefore out of the scope of proteomic approaches, metabolomics analysis revealed an extremely various set of PC, produced upon Cd stress [33, 123, 124]. *Arabidopsis* cells were shown to be able to synthesize not only the canonical PC ( $\text{PC}_n$ ), but also several iso- $\text{PC}_n$ , (( $\gamma$ Glu-Cys) $_n$ -Ser, ( $\gamma$ Glu-Cys) $_2$ -Glu, ( $\gamma$ Glu-Cys) $_3$ -Gln), homo- $\text{PC}_n$  (( $\gamma$ Glu-Cys) $_n$ -Ala), or desGlu $\text{PC}_n$  (Cys-( $\gamma$ Glu-Cys) $_n$ -Gly) [33]. This occurrence of iso- and homo-PC in the same



- [6] Clemens, S., Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. *Biochimie* 2006, **88**, 1707–1719.
- [7] Hall, J. L., Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *J. Exp. Bot.* 2002, **53**, 1–11.
- [8] Cobbett, C. S., Phytochelatin biosynthesis and function in heavy-metal detoxification. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2000, **3**, 211–216.
- [9] Rauser, W. E., Phytochelatin. *Annu. Rev. Biochem.* 1990, **59**, 61–86.
- [10] Zenk, M. H., Heavy metal detoxification in higher plants – a review. *Gene* 1996, **179**, 21–30.
- [11] Verbruggen, N., Hermans, C., Schat, H., Molecular mechanisms of metal hyperaccumulation in plants. *New Phytol.* 2009, **181**, 759–776.
- [12] Ahsan, N., Renaut, J., Komatsu, S., Recent developments in the application of proteomics to the analysis of plant responses to heavy metals. *Proteomics* 2009, **9**, 2602–2621.
- [13] Kamo, M., Kawakami, T., Miyatake, N., Tsugita, A., Separation and characterization of *Arabidopsis thaliana* proteins by two-dimensional gel electrophoresis. *Electrophoresis* 1995, **16**, 423–430.
- [14] Gallardo, K., Job, C., Groot, S. P., Puype, M. et al., Proteomic analysis of *Arabidopsis* seed germination and priming. *Plant Physiol.* 2001, **126**, 835–848.
- [15] Gialalisco, P., Nordhoff, E., Kreitler, T., Kloppel, K. D. et al., Proteome analysis of *Arabidopsis thaliana* by two-dimensional gel electrophoresis and matrix-assisted laser desorption/ionisation-time of flight mass spectrometry. *Proteomics* 2005, **5**, 1902–1913.
- [16] Sarry, J. E., Kuhn, L., Le Lay, P., Garin, J., Bourguignon, J., Dynamics of *Arabidopsis thaliana* soluble proteome in response to different nutrient culture conditions. *Electrophoresis* 2006, **27**, 495–507.
- [17] Mechin, V., Balliau, T., Chateau-Joubert, S., Davanture, M. et al., A two-dimensional proteome map of maize endosperm. *Phytochemistry* 2004, **65**, 1609–1618.
- [18] Herbette, S., Taconnat, L., Hugouvieux, V., Piette, L. et al., Genome-wide transcriptome profiling of the early cadmium response of *Arabidopsis* roots and shoots. *Biochimie* 2006, **88**, 1751–1765.
- [19] Dutilleul, C., Jourdain, A., Bourguignon, J., Hugouvieux, V., The *Arabidopsis* putative selenium-binding protein family: expression study and characterization of SBP1 as a potential new player in cadmium detoxification processes. *Plant Physiol.* 2008, **147**, 239–251.
- [20] Roth, U., von Roepenack-Lahaye, E., Clemens, S., Proteome changes in *Arabidopsis thaliana* roots upon exposure to Cd<sup>2+</sup>. *J. Exp. Bot.* 2006, **57**, 4003–4013.
- [21] Semane, B., Dupae, J., Cuypers, A., Noben, J. P. et al., Leaf proteome responses of *Arabidopsis thaliana* exposed to mild cadmium stress. *J. Plant Physiol.* 2010, **167**, 247–254.
- [22] Kieffer, P., Planchon, S., Oufir, M., Ziebel, J. et al., Combining proteomics and metabolite analyses to unravel cadmium stress-response in poplar leaves. *J. Proteome Res.* 2009, **8**, 400–417.
- [23] Alvarez, S., Berla, B. M., Sheffield, J., Cahoon, R. E. et al., Comprehensive analysis of the *Brassica juncea* root proteome in response to cadmium exposure by complementary proteomic approaches. *Proteomics* 2009, **9**, 2419–2431.
- [24] Aina, R., Labra, M., Fumagalli, P., Vannini, C. et al., Thiol-peptide level and proteomic changes in response to cadmium toxicity in *Oryza sativa* L. roots. *Environ. Exp. Bot.* 2007, **59**, 381–392.
- [25] Lee, K., Bae, D. W., Kim, S. H., Han, H. J. et al., Comparative proteomic analysis of the short-term responses of rice roots and leaves to cadmium. *J. Plant Physiol.* 2010, **167**, 161–168.
- [26] Rodríguez-Celma, J., Rellán-Alvarez, R., Abadía, A., Abadía, J., López-Millán, A. F., Changes induced by two levels of cadmium toxicity in the 2-DE protein profile of tomato roots. *J. Proteomics* 2010, **73**, 1694–1706.
- [27] Kieffer, P., Dommes, J., Hoffmann, L., Hausman, J. F., Renaut, J., Quantitative changes in protein expression of cadmium-exposed poplar plants. *Proteomics* 2008, **8**, 2514–2530.
- [28] Kieffer, P., Schroder, P., Dommes, J., Hoffmann, L. et al., Proteomic and enzymatic response of poplar to cadmium stress. *J. Proteomics* 2009, **72**, 379–396.
- [29] Durand, T. C., Sergeant, K., Planchon, S., Carpin, S. et al., Acute metal stress in *Populus tremula* × *P. alba* (717-1B4 genotype): leaf and cambial proteome changes induced by cadmium (2+). *Proteomics* 2010, **10**, 349–368.
- [30] Visioli, G., Marmiroli, M., Marmiroli, N., Two-dimensional liquid chromatography technique coupled with mass spectrometry analysis to compare the proteomic response to cadmium stress in plants. *J. Biomed. Biotechnol.* 2010.
- [31] Hajdúch, M., Rakwal, R., Agrawal, G. K., Yonekura, M., Pretova, A., High-resolution two-dimensional electrophoresis separation of proteins from metal-stressed rice (*Oryza sativa* L.) leaves: drastic reductions/fragmentation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase and induction of stress-related proteins. *Electrophoresis* 2001, **22**, 2824–2831.
- [32] Ahsan, N., Lee, S. H., Lee, D. G., Lee, H. et al., Physiological and protein profiles alternation of germinating rice seedlings exposed to acute cadmium toxicity. *C. R. Biol.* 2007, **330**, 735–746.
- [33] Sarry, J. E., Kuhn, L., Ducruix, C., Lafaye, A. et al., The early responses of *Arabidopsis thaliana* cells to cadmium exposure explored by protein and metabolite profiling analyses. *Proteomics* 2006, **6**, 2180–2198.
- [34] Sobkowiak, R., Deckert, J., Proteins induced by cadmium in soybean cells. *J. Plant Physiol.* 2006, **163**, 1203–1206.
- [35] Tuomainen, M. H., Nunan, N., Lehesranta, S. J., Tervahauta, A. I. et al., Multivariate analysis of protein profiles of metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* accessions. *Proteomics* 2006, **6**, 3696–3706.
- [36] Gianazza, E., Wait, R., Sozzi, A., Regondi, S. et al., Growth and protein profile changes in *Lepidium sativum* L.

- plantlets exposed to cadmium. *Environ. Exp. Bot.* 2007, 59, 179–187.
- [37] Fagioni, M., Zolla, L., Does the different proteomic profile found in apical and basal leaves of spinach reveal a strategy of this plant toward cadmium pollution response? *J. Proteome Res.* 2009, 8, 2519–2529.
- [38] Hradilova, J., Rehulka, P., Rehulkova, H., Vrbova, M. et al., Comparative analysis of proteomic changes in contrasting flax cultivars upon cadmium exposure. *Electrophoresis* 2010, 31, 421–431.
- [39] Repetto, O., Bestel-Corre, G., Dumas-Gaudot, E., Berta, G. et al., Targeted proteomics to identify cadmium-induced protein modifications in *Glomus mosseae*-inoculated pea roots. *New Phytol.* 2003, 157, 555–567.
- [40] Aloui, A., Recorbet, G., Gollotte, A., Robert, F. et al., On the mechanisms of cadmium stress alleviation in *Medicago truncatula* by arbuscular mycorrhizal symbiosis: a root proteomic study. *Proteomics* 2009, 9, 420–433.
- [41] Farinati, S., DalCorso, G., Bona, E., Corbella, M. et al., Proteomic analysis of *Arabidopsis halleri* shoots in response to the heavy metals cadmium and zinc and rhizosphere microorganisms. *Proteomics* 2009, 9, 4837–4850.
- [42] Sweetlove, L. J., Heazlewood, J. L., Herald, V., Holtzapffel, R. et al., The impact of oxidative stress on *Arabidopsis* mitochondria. *Plant J.* 2002, 32, 891–904.
- [43] Bardel, J., Louwagie, M., Jaquinod, M., Jourdain, A. et al., A survey of the plant mitochondrial proteome in relation to development. *Proteomics* 2002, 2, 880–898.
- [44] Bae, M. S., Cho, E. J., Choi, E. Y., Park, O. K., Analysis of the *Arabidopsis* nuclear proteome and its response to cold stress. *Plant J.* 2003, 36, 652–663.
- [45] Taylor, N. L., Heazlewood, J. L., Day, D. A., Millar, A. H., Differential impact of environmental stresses on the pea mitochondrial proteome. *Mol. Cell. Proteomics* 2005, 4, 1122–1133.
- [46] Giacomelli, L., Rudella, A., van Wijk, K. J., High light response of the thylakoid proteome in *Arabidopsis* wild type and the ascorbate-deficient mutant *vtc2-2*. A comparative proteomics study. *Plant Physiol.* 2006, 141, 685–701.
- [47] Goulas, E., Schubert, M., Kieselbach, T., Kleczkowski, L. A. et al., The chloroplast lumen and stromal proteomes of *Arabidopsis thaliana* show differential sensitivity to short- and long-term exposure to low temperature. *Plant J.* 2006, 47, 720–734.
- [48] Agrawal, G. K., Bourguignon, J., Rolland, N., Ephritikhine, G. et al., Plant organelle proteomics: collaborating for optimal cell function. *Mass. Spec. Rev.* 2011, in press.
- [49] Fagioni, M., Damici, G. M., Timperio, A. M., Zolla, L., Proteomic analysis of multiprotein complexes in the thylakoid membrane upon cadmium treatment. *J. Proteome Res.* 2009, 8, 310–326.
- [50] Dietz, K. J., Plant peroxiredoxins. *Annu. Rev. Plant Biol.* 2003, 54, 93–107.
- [51] Barranco-Medina, S., Lazaro, J. J., Dietz, K. J., The oligomeric conformation of peroxiredoxins links redox state to function. *FEBS Lett.* 2009, 583, 1809–1816.
- [52] Babychuk, E., Kushnir, S., Belles-Boix, E., Van Montagu, M., Inze, D., *Arabidopsis thaliana* NADPH oxidoreductase homologs confer tolerance of yeasts toward the thiol-oxidizing drug diamide. *J. Biol. Chem.* 1995, 270, 26224–26231.
- [53] Davies, M. J., The oxidative environment and protein damage. *Biochim. et Biophys. Acta: Proteins Proteomics* 2005, 1703, 93–109.
- [54] Tarrago, L., Laugier, E., Rey, P., Protein-repairing methionine sulfoxide reductases in photosynthetic organisms: gene organization, reduction mechanisms, and physiological roles. *Mol. Plant* 2009, 2, 202–217.
- [55] Tarrago, L., Laugier, E., Zaffagnini, M., Marchand, C. et al., Regeneration mechanisms of *Arabidopsis thaliana* methionine sulfoxide reductases b by glutaredoxins and thioredoxins. *J. Biol. Chem.* 2009, 284, 18963–18971.
- [56] Tarrago, L., Laugier, E., Zaffagnini, M., Marchand, C. H. et al., Plant thioredoxin CDSP32 regenerates 1-Cys methionine sulfoxide reductase B activity through the direct reduction of sulfenic acid. *J. Biol. Chem.* 2010, 285, 14964–14972.
- [57] Grimaud, R., Ezraty, B., Mitchell, J. K., Lafitte, D. et al., Repair of oxidized proteins – identification of a new methionine sulfoxide reductase. *J. Biol. Chem.* 2001, 276, 48915–48920.
- [58] Moller, I. M., Jensen, P. E., Hansson, A., Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 2007, 58, 459–481.
- [59] Romero-Puertas, M. C., Palma, J. M., Gomez, M., Del Rio, L. A., Sandalio, L. M., Cadmium causes the oxidative modification of proteins in pea plants. *Plant Cell Environ.* 2002, 25, 677–686.
- [60] Basset, G., Raymond, P., Malek, L., Brouquisse, R., Changes in the expression and the enzymic properties of the 20S proteasome in sugar-starved maize roots. Evidence for an in vivo oxidation of the proteasome. *Plant Physiol.* 2002, 128, 1149–1162.
- [61] Pena, L. B., Pasquini, L. A., Tomaro, M. L., Gallego, S. M., 20S proteasome and accumulation of oxidized and ubiquitinated proteins in maize leaves subjected to cadmium stress. *Phytochemistry* 2007, 68, 1139–1146.
- [62] Djebali, W., Gallusci, P., Polge, C., Boulila, L. et al., Modifications in endopeptidase and 20S proteasome expression and activities in cadmium treated tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plants. *Planta* 2008, 227, 625–639.
- [63] Jain, V., Kaiser, W., Huber, S. C., Cytokinin inhibits the proteasome-mediated degradation of carbonylated proteins in *Arabidopsis* leaves. *Plant Cell Physiol.* 2008, 49, 843–852.
- [64] Polge, C., Jaquinod, M., Holzer, F., Bourguignon, J. et al., Evidence for the existence in *Arabidopsis thaliana* of the proteasome proteolytic pathway. Activation in response to cadmium. *J. Biol. Chem.* 2009, 284, 35412–35424.
- [65] Vido, K., Spector, D., Lagniel, G., Lopez, S. et al., A proteome analysis of the cadmium response in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 2001, 276, 8469–8474.
- [66] Forzani, C., Lobreaux, S., Mari, S., Briat, J. F., Lebrun, M., Metal resistance in yeast mediated by the expression of a



- maize 20S proteasome alpha subunit. *Gene* 2002, 293, 199–204.
- [67] Hourton-Cabassa, C., Ambard-Bretteville, F., Moreau, F., de Virville, J. D. et al., Stress induction of mitochondrial formate dehydrogenase in potato leaves. *Plant Physiol.* 1998, 116, 627–635.
- [68] Fukusaki, E. I., Ikeda, T., Shiraishi, T., Nishikawa, T., Kobayashi, A., Formate dehydrogenase gene of *Arabidopsis thaliana* is induced by formaldehyde and not by formic acid. *J. Biosci. Bioeng.* 2000, 90, 691–693.
- [69] Gadda, G., Francis, K., Nitronate monooxygenase, a model for anionic flavin semiquinone intermediates in oxidative catalysis. *Arch. Biochem. Biophys.* 2010, 493, 53–61.
- [70] Puig, S., Mira, H., Dorcey, E., Sancenon, V. et al., Higher plants possess two different types of ATX1-like copper chaperones. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007, 354, 385–390.
- [71] Vierling, E., The roles of heat-shock proteins in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 1991, 42, 579–620.
- [72] Wang, W. X., Vinocur, B., Shoseyov, O., Altman, A., Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends Plant Sci.* 2004, 9, 244–252.
- [73] Marrs, K. A., The functions and regulation of glutathione S-transferases in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 1996, 47, 127–158.
- [74] Edwards, R., Dixon, D. P., Walbot, V., Plant glutathione S-transferases: enzymes with multiple functions in sickness and in health. *Trends Plant Sci.* 2000, 5, 193–198.
- [75] Rea, P. A., Li, Z. S., Lu, Y. P., Drozdowicz, Y. M., Martinoia, E., From vacuolar GS-X pumps to multispecific ABC transporters. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 1998, 49, 727–760.
- [76] Edwards, R., Dixon, D. P., Plant glutathione transferases. *Methods Enzymol.* 2005, 401, 169–186.
- [77] Wagner, U., Edwards, R., Dixon, D. P., Mauch, F., Probing the diversity of the *Arabidopsis* glutathione S-transferase gene family. *Plant Mol. Biol.* 2002, 49, 515–532.
- [78] Zhou, J. M., Goldsbrough, P. B., An *Arabidopsis* gene with homology to glutathione S-transferase is regulated by ethylene. *Plant Mol. Biol.* 1993, 22, 517–523.
- [79] Adamis, P. D. B., Gomes, D. S., Pinto, M., Panek, A. D., Eleutherio, E. C. A., The role of glutathione transferases in cadmium stress. *Toxicol. Lett.* 2004, 154, 81–88.
- [80] Sels, J., Mathys, J., De Coninck, B. M., Cammue, B. P., De Bolle, M. F., Plant pathogenesis-related (PR) proteins: a focus on PR peptides. *Plant Physiol. Biochem.* 2008, 46, 941–950.
- [81] Jiang, Y., Yang, B., Harris, N. S., Deyholos, M. K., Comparative proteomic analysis of NaCl stress-responsive proteins in *Arabidopsis* roots. *J. Exp. Bot.* 2007, 58, 3591–3607.
- [82] Jones, A. M., Thomas, V., Bennett, M. H., Mansfield, J., Grant, M., Modifications to the *Arabidopsis* defense proteome occur prior to significant transcriptional change in response to inoculation with *Pseudomonas syringae*. *Plant Physiol.* 2006, 142, 1603–1620.
- [83] Heiss, S., Schafer, H. J., Haag-Kerwer, A., Rausch, T., Cloning sulfur assimilation genes of *Brassica juncea* L.: cadmium differentially affects the expression of a putative low-affinity sulfate transporter and isoforms of ATP sulfurylase and APS reductase. *Plant Mol. Biol.* 1999, 39, 847–857.
- [84] Harada, E., Yamaguchi, Y., Koizumi, N., Sano, H., Cadmium stress induces production of thiol compounds and transcripts for enzymes involved in sulfur assimilation pathways in *Arabidopsis*. *J. Plant Physiol.* 2002, 159, 445–448.
- [85] May, M. J., Vernoux, T., Sanchez-Fernandez, R., Van Montagu, M., Inze, D., Evidence for posttranscriptional activation of gamma-glutamylcysteine synthetase during plant stress responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998, 95, 12049–12054.
- [86] Weber, M., Trampczynska, A., Clemens, S., Comparative transcriptome analysis of toxic metal responses in *Arabidopsis thaliana* and the Cd<sup>2+</sup>-hypertolerant facultative metallophyte *Arabidopsis halleri*. *Plant Cell Environ.* 2006, 29, 950–963.
- [87] Hugouvieux, V., Dutilleul, C., Jourdain, A., Reynaud, F. et al., *Arabidopsis* putative selenium-binding protein1 expression is tightly linked to cellular sulfur demand and can reduce sensitivity to stresses requiring glutathione for tolerance. *Plant Physiol.* 2009, 151, 768–781.
- [88] Szponarski, W., Sommerer, N., Boyer, J. C., Rossignol, M., Gibrat, R., Large-scale characterization of integral proteins from *Arabidopsis* vacuolar membrane by two-dimensional liquid chromatography. *Proteomics* 2004, 4, 397–406.
- [89] Shimaoka, T., Ohnishi, M., Sazuka, T., Mitsuhashi, N. et al., Isolation of intact vacuoles and proteomic analysis of tonoplast from suspension-cultured cells of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 2004, 45, 672–683.
- [90] Carter, C., Pan, S. Q., Jan, Z. H., Avila, E. L. et al., The vegetative vacuole proteome of *Arabidopsis thaliana* reveals predicted and unexpected proteins. *Plant Cell* 2004, 16, 3285–3303.
- [91] Jaquinod, M., Villiers, F., Kieffer-Jaquinod, S., Hugouvieux, V. et al., A proteomics dissection of *Arabidopsis thaliana* vacuoles isolated from cell culture. *Mol. Cell. Proteomics* 2007, 6, 394–412.
- [92] Jaquinod, M., Villiers, F., Kieffer-Jaquinod, S., Hugouvieux, V. et al., A proteomics approach highlights a myriad of transporters in the *Arabidopsis thaliana* vacuolar membrane. *Plant Signal. Behav.* 2007, 2, 413–415.
- [93] Endler, A., Meyer, S., Schelbert, S., Schneider, T. et al., Identification of a vacuolar sucrose transporter in barley and *Arabidopsis* mesophyll cells by a tonoplast proteomic approach. *Plant Physiol.* 2006, 141, 196–207.
- [94] Schmidt, U. G., Endler, A., Schelbert, S., Brunner, A. et al., Novel tonoplast transporters identified using a proteomic approach with vacuoles isolated from cauliflower buds. *Plant Physiol.* 2007, 145, 216–229.

- [95] Martinoia, E., Maeshima, M., Neuhaus, H. E., Vacuolar transporters and their essential role in plant metabolism. *J. Exp. Bot.* 2007, 58, 83–102.
- [96] Schneider, T., Schellenberg, M., Meyer, S., Keller, F. et al., Quantitative detection of changes in the leaf-mesophyll tonoplast proteome in dependency of a cadmium exposure of barley (*Hordeum vulgare* L.) plants. *Proteomics* 2009, 9, 2668–2677.
- [97] Li, Z. S., Lu, Y. P., Zhen, R. G., Szczypka, M. et al., A new pathway for vacuolar cadmium sequestration in *Saccharomyces cerevisiae*: YCF1-catalyzed transport of bis(glutathionato)cadmium. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 1997, 94, 42–47.
- [98] Ortiz, D. F., Ruscitti, T., McCue, K. F., Ow, D. W., Transport of metal-binding peptides by HMT1, a fission yeast ABC-type vacuolar membrane-protein. *J. Biol. Chem.* 1995, 270, 4721–4728.
- [99] Preveral, S., Gayet, L., Moldes, C., Hoffmann, J. et al., A common highly conserved cadmium detoxification mechanism from bacteria to humans: heavy metal tolerance conferred by the ATP-binding cassette (ABC) transporter SpHMT1 requires glutathione but not metal-chelating phytochelatin peptides. *J. Biol. Chem.* 2009, 284, 4936–4943.
- [100] Sooksa-Nguan, T., Yakubov, B., Kozlovskyy, V. I., Barkume, C. M. et al., *Drosophila* ABC transporter, DmHMT-1, confers tolerance to cadmium. DmHMT-1 and its yeast homolog, SpHMT-1, are not essential for vacuolar phytochelatin sequestration. *J. Biol. Chem.* 2009, 284, 354–362.
- [101] Vogelilange, R., Wagner, G. J., Subcellular-localization of cadmium and cadmium-binding peptides in tobacco-leaves – implication of a transport function for cadmium-binding peptides. *Plant Physiol.* 1990, 92, 1086–1093.
- [102] Song, W. Y., Park, J., Mendoza-Cozatl, D. G., Suter-Grote-meyer, M. et al., Arsenic tolerance in *Arabidopsis* is mediated by two ABCC-type phytochelatin transporters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2010, 107, 21187–21192.
- [103] Hirschi, K. D., Korenkov, V. D., Wilganowski, N. L., Wagner, G. J., Expression of *Arabidopsis* CAX2 in tobacco. Altered metal accumulation and increased manganese tolerance. *Plant Physiol.* 2000, 124, 125–133.
- [104] Koren'kov, V., Park, S., Cheng, N. H., Sreevidya, C. et al., Enhanced  $\text{Cd}^{2+}$ -selective root-tonoplast-transport in tobaccos expressing *Arabidopsis* cation exchangers. *Planta* 2007, 225, 403–411.
- [105] Morel, M., Crouzet, J., Gravot, A., Auroy, P. et al., AtHMA3, a P-1B-ATPase allowing Cd/Zn/Co/Pb vacuolar storage in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 2009, 149, 894–904.
- [106] Thomine, S., Wang, R. C., Ward, J. M., Crawford, N. M., Schroeder, J. I., Cadmium and iron transport by members of a plant metal transporter family in *Arabidopsis* with homology to Nramp genes. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2000, 97, 4991–4996.
- [107] Lanquar, V., Lelievre, F., Bolte, S., Hames, C. et al., Mobilization of vacuolar iron by AtNRAMP3 and AtNRAMP4 is essential for seed germination on low iron. *EMBO J.* 2005, 24, 4041–4051.
- [108] Lanquar, V., Ramos, M. S., Lelievre, F., Barbier-Brygoo, H. et al., Export of vacuolar manganese by AtNRAMP3 and AtNRAMP4 is required for optimal photosynthesis and growth under manganese deficiency. *Plant Physiol.* 2010, 152, 1986–1999.
- [109] Lanquar, V., Kuhn, L., Lelievre, F., Khafif, M. et al., N-15-Metabolic labeling for comparative plasma membrane proteomics in *Arabidopsis* cells. *Proteomics* 2007, 7, 750–754.
- [110] Kim, D. Y., Bovet, L., Maeshima, M., Martinoia, E., Lee, Y., The ABC transporter AtPDR8 is a cadmium extrusion pump conferring heavy metal resistance. *Plant J.* 2007, 50, 207–218.
- [111] Li, J. Y., Fu, Y. L., Pike, S. M., Bao, J. et al., The *Arabidopsis* nitrate transporter NRT1.8 functions in nitrate removal from the xylem sap and mediates cadmium tolerance. *Plant Cell* 2010, 22, 1633–1646.
- [112] Fiehn, O., Kopka, J., Dormann, P., Altmann, T. et al., Metabolite profiling for plant functional genomics. *Nat. Biotechnol.* 2000, 18, 1157–1161.
- [113] Sato, S., Soga, T., Nishioka, T., Tomita, M., Simultaneous determination of the main metabolites in rice leaves using capillary electrophoresis mass spectrometry and capillary electrophoresis diode array detection. *Plant J.* 2004, 40, 151–163.
- [114] Tolstikov, V. V., Lommen, A., Nakanishi, K., Tanaka, N., Fiehn, O., Monolithic silica-based capillary reversed-phase liquid chromatography/electrospray mass spectrometry for plant metabolomics. *Anal. Chem.* 2003, 75, 6737–6740.
- [115] Goodacre, R., York, E. V., Heald, J. K., Scott, I. M., Chemometric discrimination of unfractionated plant extracts analyzed by electrospray mass spectrometry. *Phytochemistry* 2003, 62, 859–863.
- [116] Hirai, M. Y., Yano, M., Goodenowe, D. B., Kanaya, S. et al., Integration of transcriptomics and metabolomics for understanding of global responses to nutritional stresses in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2004, 101, 10205–10210.
- [117] Wolfender, J. L., Ndjoko, K., Hostettmann, K., Liquid chromatography with ultraviolet absorbance-mass spectrometric detection and with nuclear magnetic resonance spectroscopy: a powerful combination for the on-line structural investigation of plant metabolites. *J. Chromatogr. A* 2003, 1000, 437–455.
- [118] Ward, J. L., Harris, C., Lewis, J., Beale, M. H., Assessment of H-1 NMR spectroscopy and multivariate analysis as a technique for metabolite fingerprinting of *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry* 2003, 62, 949–957.
- [119] Jahangir, M., Abdel-Farid, I. B., Choi, Y. H., Verpoorte, R., Metal ion-inducing metabolite accumulation in *Brassica rapa*. *J. Plant Physiol.* 2008, 165, 1429–1437.
- [120] Gromova, M., Roby, C., Toward *Arabidopsis thaliana* hydrophilic metabolome: assessment of extraction methods and quantitative  $^1\text{H}$  NMR. *Physiol. Plantarum* 2010, 140, 111–127.
- [121] Bailey, N. J. C., Oven, M., Holmes, E., Nicholson, J. K., Zenk, M. H., Metabolomic analysis of the consequences of



- cadmium exposure in *Silene cucubalus* cell cultures via H-1 NMR spectroscopy and chemometrics. *Phytochemistry* 2003, 62, 851–858.
- [122] Sun, X. M., Zhang, J. X., Zhang, H. J., Ni, Y. W. et al., The responses of *Arabidopsis thaliana* to cadmium exposure explored via metabolite profiling. *Chemosphere* 2010, 78, 840–845.
- [123] Ducruix, C., Junot, C., Fievet, J. B., Villiers, F. et al., New insights into the regulation of phytochelatin biosynthesis in *A. thaliana* cells from metabolite profiling analyses. *Biochimie* 2006, 88, 1733–1742.
- [124] Mendoza-Cozatl, D. G., Butko, E., Springer, F., Torpey, J. W. et al., Identification of high levels of phytochelatin, glutathione and cadmium in the phloem sap of *Brassica napus*. A role for thiol-peptides in the long-distance transport of cadmium and the effect of cadmium on iron translocation. *Plant J.* 2008, 54, 249–259.
- [125] Anderson, J. V., Chevone, B. I., Hess, J. L., Seasonal-variation in the antioxidant system of eastern white-pine needles – evidence for thermal dependence. *Plant Physiol.* 1992, 98, 501–508.
- [126] Raggi, M. A., Mandrioli, R., Casamenti, G., Musiani, D., Marini, M., HPLC determination of glutathione and other thiols in human mononuclear blood cells. *Biomed. Chromatogr.* 1998, 12, 262–266.
- [127] Rueggsegger, A., Brunold, C., Effect of cadmium on gamma-glutamylcysteine synthesis in maize seedlings. *Plant Physiol.* 1992, 99, 428–433.
- [128] Meuwly, P., Rauser, W. E., Alteration of thiol pools in roots and shoots of maize seedlings exposed to cadmium – adaptation and developmental cost. *Plant Physiol.* 1992, 99, 8–15.
- [129] Parmentier, C., Leroy, P., Wellman, M., Nicolas, A., Determination of cellular thiols and glutathione-related enzyme activities: versatility of high-performance liquid chromatography spectrofluorimetric detection. *J. Chromatogr. B* 1998, 719, 37–46.
- [130] Liu, Y. G., Wang, X., Zeng, G. M., Qu, D. et al., Cadmium-induced oxidative stress and response of the ascorbate-glutathione cycle in *Beckhamia nivea* (L.) Gaud. *Chemosphere* 2007, 69, 99–107.
- [131] Baralkiewicz, D., Kozka, M., Piechalak, A., Tomaszewska, B., Sobczak, P., Determination of cadmium and lead species and phytochelatin in pea (*Pisum sativum*) by HPLC-ICP-MS and HPLC-ESI-MSn. *Talanta* 2009, 79, 493–498.
- [132] Hell, R., Bergmann, L., Gamma-glutamylcysteine synthase in higher plants. Catalytic properties and subcellular localization. *Planta* 1990, 180, 603–612.
- [133] Petrak, J., Ivanek, R., Toman, O., Cmejla, R. et al., Deja vu in proteomics. A hit parade of repeatedly identified differentially expressed proteins. *Proteomics* 2008, 8, 1744–1749.
- [134] Wang, P., Bouwman, F. G., Mariman, E. C. M., Generally detected proteins in comparative proteomics – a matter of cellular stress response? *Proteomics* 2009, 9, 2955–2966.
- [135] Ferro, M., Brugiére, S., Salvi, D., Seigneurin-Berny, D. et al., AT\_CHLORO, a comprehensive chloroplast proteome database with subplastidial localization and curated information on envelope proteins. *Mol. Cell. Proteomics* 2010, 9, 1063–1084.
- [136] Wojas, S., Ruszczynska, A., Ewa, B., Clemens, S., Antosiewicz, D. M., The role of subcellular distribution of cadmium and phytochelatin in the generation of distinct phenotypes of AtPCS1- and CePCS3-expressing tobacco. *J. Plant Physiol.* 2010, 167, 981–988.
- [137] Ytterberg, A. J., Jensen, O. N., Modification-specific proteomics in plant biology. *J. Proteomics* 2010, 73, 2249–2266.

## Bibliographie

### A

---

- Aiken CT, Kaake RM, Wang X, Huang L** (2011) Oxidative stress-mediated regulation of proteasome complexes. *Mol Cell Proteomics* **10** (5) Review
- Akaboshi M, Hashimoto H, Ishida H, Saijo S, Koizumi N, Sato M, Shimizu T** (2008) The crystal structure of plant-specific calcium-binding protein AtCBL2 in complex with the regulatory domain of AtCIPK14. *J Mol Biol* **377**: 246-257
- Akoh CC, Lee GC, Liaw YC, Huang TH, Shaw JF** (2004) GDSL family of serine esterases/lipases. *Prog Lipid Res* **43**: 534-552
- Agrawal GK, Bourguignon J, Rolland N, Ferro M, Jaquinod M, Alexiou KG, Chardot T, et al.** (2010 a). Plant organelle proteomics: collaborative for optimal cell function. *Mass Spectrometry Reviews*
- Agrawal GK, Jwa NS, Lebrun MH, Job D, Rakwal R** (2010 b) Plant secretome: unlocking secrets of the secreted proteins. *Proteomics* **10** (4) : 799-827.
- Alexandersson E, Saalbach G, Larsson C, Kjellbom P** (2004) Arabidopsis plasma membrane proteomics identifies components of transport, signal transduction and membrane trafficking. *Plant Cell Physiol* **45**: 1543-1556
- Altmann F, Paschinger K, Dalik T and Vorauer K** (1997) Characterisation of peptide-N4-(N-acetyl- $\alpha$ -glucosaminyl) asparagine amidase A and its N-glycans *Eur. J. Biochem.* **252**, 1182123
- Anderson, N.L. and N.G. Anderson** (2002) The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects. *Mol Cell Proteomics* **1**(11): 845-67.
- Antao CM, Malcata FX** (2005) Plant serine proteases: biochemical, physiological and molecular features. *Plant Physiol Biochem* **43**: 637-650
- Apse MP, Blumwald E** (2007) Na<sup>+</sup> transport in plants. *FEBS Lett* **581**: 2247-2254
- Aramini JM, Hiraoki T, Ke Y, Nitta K, Vogel HJ.** (1995) Cadmium-113 NMR studies of bovine and human  $\alpha$ -lactalbumin and equine lysozyme. *J Biochem* **117**(3):623-8
- Atteia A, van Lis R, Mendoza-Hernandez G, Henze K, Martin W, Riveros-Rosas H, Gonzalez-Halphen D** (2003) Bifunctional aldehyde/alcohol dehydrogenase (ADHE) in chlorophyte algal mitochondria. *Plant Mol Biol* **53**: 175-188
- Aubert S, Gout E, Bligny R, Marty-Mazars D, Barrieu F, Alabouvette J, Marty F, Douce R** (1996) Ultrastructural and biochemical characterization of autophagy in higher plant cells subjected to carbon deprivation: control by the supply of mitochondria with respiratory substrates. *J Cell Biol* **133**: 1251-1263

### B

---

- Babusiak M, Man P, Petrak J, Vyoral D** (2007) Native proteomic analysis of protein complexes in murine intestinal brush border membranes. *Proteomics* **7** (1): 121-9
- Bae MS, Cho EJ, Choi EY, Park OK.** (2003) Analysis of the Arabidopsis nuclear proteome and its response to cold stress. *Plant J.* **36**(5):652-63.
- Bahrami AR, Bastow R, Rolfe S, Price C et al.** (2002) A role for nuclear localised proteasomes in mediating auxin action. *Plant J.* **30** : 691-698

- Ballatori N, Hammond CL, Cunningham JB, Krance SM, Marchan R.** (2005) Molecular mechanisms of reduced glutathione transport: role of the MRP/CFTR/ABCC and OATP/SLC21A families of membrane proteins. *Toxicol Appl Pharmacol* **204**(3):238-55 Review
- Barbier O, Jacquillet G, Tauc M, Poujeol P, Cougnon M.** (2004) Acute study of interaction among cadmium, calcium, and zinc transport along the rat nephron in vivo. *Am J Physiol Renal Physiol.* **287**(5):1067-1075.
- Bardel J, Louwagie M, Jaquinod M, Jourdain A, Luche S, Rabilloud T, Macherel D, Garin J, Bourguignon J** (2002) A survey of the plant mitochondrial proteome in relation to development. *Proteomics* **2** : 880-898
- Barrett M** (1995) Metabolism of herbicides by cytochrome P450 in corn. *Drug Metabol Drug Interact* **12** : 299-315
- Barroso JB, Corpas FJ, Carreras A, Rodriguez-Serrano M, Esteban FJ, Fernandez-Ocana A, Chaki M, Romero-Puertas MC, Valderrama R, Sandalio LM, del Rio LA** (2006) Localization of S-nitrosoglutathione and expression of S-nitrosoglutathione reductase in pea plants under cadmium stress. *J Exp Bot* **57**: 1785-1793
- Bassham DC, Laporte M, Marty F, Moriyasu Y, Ohsumi Y, Olsen LJ, Yoshimoto K** (2006) Autophagy in development and stress responses of plants. *Autophagy* **2** : 2-11
- Batistic O, Waadt R, Steinhorst L, Held K, Kudla J** (2010). CBL-mediated targeting of CIPKs facilitates the decoding of calcium signals emanating from distinct cellular stores. *The Plant journal: for cell and molecular biology* **61** (2) : 211-22
- Belenghi B, Acconcia F, Trovato M, Perazzolli M, Bocedi A, Polticelli F, Ascenzi P, Delledonne M** (2003) AtCYS1, a cystatin from *Arabidopsis thaliana*, suppresses hypersensitive cell death. *Eur J Biochem* **270** : 2593-2604
- Bennett MD** (2003) Comparisons with *Caenorhabditis* (100 Mb) and *Drosophila* (175 Mb) Using Flow Cytometry Show Genome Size in *Arabidopsis* to be 157 Mb and thus 25 % Larger than the *Arabidopsis* Genome Initiative Estimate of 125 Mb. *Annals of Botany* **91** (5) : 547-557
- Besson-Bard A, Pugin A, Wendehenne D** (2008) New insights into nitric oxide signaling in plants. *Annu Rev Plant Biol* **59** : 21-39
- Bethke PC, Hillmer S, Jones RL** (1996) Isolation of Intact Protein Storage Vacuoles from Barley Aleurone (Identification of Aspartic and Cysteine Proteases). *Plant Physiol* **110** : 521-529
- Biemann, K** (1990) Appendix 5. Nomenclature for peptide fragment ions (positive ions). *Methods Enzymol* **193** : 886-887
- Beynon RJ, Doherty MK, Pratt JM, Gaskell SJ** (2005) Multiplexed absolute quantification in proteomics using artificial QCAT proteins of concatenated signature peptides. *Nature Methods* **2** (8): 587-589
- Bindschedler LV and Rainer C** (2011) Quantitative plant proteomics. *Proteomics* **11** (4) : 756-75 Review
- Binzel ML, Hess FD, Bressan RA, Hasegawa PM** (1988) Intracellular Compartmentation of Ions in Salt Adapted Tobacco Cells. *Plant Physiol* **86** : 607-614
- Bishop JG, Dean AM, Mitchell-Olds T** (2000) Rapid evolution in plant chitinases : molecular targets of selection in plant-pathogen coevolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97** : 5322-5327
- Blee E** (2002) Impact of phyto-oxylipins in plant defense. *Trends Plant Sci* **7** : 315-322
- Blumwald E, Poole RJ** (1985a) Nitrate storage and retrieval in *Beta vulgaris*: Effects of nitrate and chloride on proton gradients in tonoplast vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82** : 3683-3687
- Blumwald E, Poole RJ** (1985b) Na/H Antiport in Isolated Tonoplast Vesicles from Storage Tissue of *Beta vulgaris*. *Plant Physiol* **78** : 163-167
- Boller T, Kende H** (1979) Hydrolytic Enzymes in the Central Vacuole of Plant Cells. *Plant Physiol* **63** : 1123-1132
- Bolter B, Soll J, Hill K, Hemmler R, Wagner R** (1999) A rectifying ATP-regulated solute channel in the chloroplastic outer envelope from pea. *Embo J* **18** : 5505-5516
- Bonifacino JS, Glick BS** (2004) The mechanisms of vesicle budding and fusion. *Cell* **116** : 153-166
- Book AJ, Yang P, Scalf M, Smith LM, Vierstra RD** (2005) Tripeptidyl peptidase II. An oligomeric protease complex from *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **138** : 1046-1057

- Boursiac Y, Chen S, Luu D-trung, Sorieul M, Dries NVD, & Maurel C** (2005). Early Effects of Salinity on Water Transport in Arabidopsis Roots. Molecular and Cellular Features of Aquaporin Expression 1. *Society* **139** : 790-805.
- Brodersen P, Petersen M, Pike HM, Olszak B, Skov S, Odum N, Jorgensen LB, Brown RE, Mundy J** (2002) Knockout of Arabidopsis accelerated-cell-death11 encoding a sphingosine transfer protein causes activation of programmed cell death and defense. *Genes Dev.* **16**(4): 490-502
- Bousquet-Dubouch MP, Baudalet E, Guérin F, Matondo M, Uttenweiler-Joseph S, Burlet-Schiltz O, Monsarrat B** (2009) Affinity purification strategy to capture human endogenous proteasome complexes diversity and to identify proteasome-interacting proteins. *Molecular & cellular proteomics* **8** (5) : 1150-64
- Bovet L, feller U, Martinoia E** (2005) Possible involvement of plant ABC transporters in cadmium detoxification: a cDNA sub-microarray approach. *Environment International* **31**: 263-267
- Briskin DP, Thornley WR, Wyse RE** (1985) Membrane Transport in Isolated Vesicles from Sugarbeet Taproot : II. Evidence for a Sucrose/H-Antiport. *Plant Physiol* **78** : 871-875
- Broadley MR, Bowen HC, Cotterill HL, Hammond JP, Meacham MC, Mead A, White PJ** (2003) Variation in the shoot calcium content of angiosperms. *J Exp Bot* **54** : 1431-1446
- Brown DC and Collins KD** (1991) Dihydroorotase from Escherichia coli substitution of Co(II) for the active site Zn(II). *The Journal of Biologicalchemistry* **266** : 1597-1604
- Browne SC, Coombe BG** (1984) Proposal for hexose group transport at the tonoplast of grape pericarp cells. *Physiol.veg.* **22** : 231-240
- Brugiere S, Kowalski S, Ferro M, Seigneurin-Berny D, Miras S, Salvi D, Ravanel S, d'Herin P, Garin J, Bourguignon J, Joyard J, Rolland N** (2004) The hydrophobic proteome of mitochondrial membranes from Arabidopsis cell suspensions. *Phytochemistry* **65** : 1693-1707
- Brun V, Dupuis A, Adrait A, Marcellin M, Thomas D, Court M, Vandenesch F, Garin J** (2007) Isotope-labeled protein standards: toward absolute quantitative proteomics. *Molecular & cellular proteomics* **6** (12) : 2139-2149
- Brun V, Masselon C, Garin J, Dupuis A** (2009) Isotope dilution strategies for absolute quantitative proteomics. *Journal of proteomics* **72** (5): 740-749
- Brunet S.** (2003) Organelle proteomics: looking at less to see more. *Trends in Cell Biology* **13** (12)
- Buchner P, Takahashi H, Hawkesford MJ** (2004) Plant sulphate transporters: co-ordination of uptake, intracellular and long-distance transport. *J Exp Bot* **55** : 1765-1773

## C

- Calikowski TT, Meulia T, Meier I** (2003) A proteomic study of the arabidopsis nuclear matrix. *J Cell Biochem* **90** (2):361-78.
- Canut H, Alibert G, Boudet AM** (1985) Hydrolysis of Intracellular Proteins in Vacuoles Isolated from Acer pseudoplatanus L. Cells. *Plant Physiol* **79** : 1090-1093
- Canut H, Dupré M, Carrasco A, Boudet AM** (1987) AtMRP2, an Arabidopsis ATP binding cassette transporter able to. *Planta* **170** : 541-549
- Carpaneto A** (2003) Nickel inhibits the slowly activating channels of radish vacuoles. *Eur Biophys J* **32** : 60-66
- Carter C, Pan S, Zouhar J, Avila EL, Girke T, Raikhel NV** (2004) The vegetative vacuole proteome of *Arabidopsis thaliana* reveals predicted and unexpected proteins. *Plant Cell* **16** : 3285-3303
- Cazale AC, Clemens S** (2001) *Arabidopsis thaliana* expresses a second functional phytochelatin synthase. *FEBS Lett* **507** : 215-219
- Chaffei C, Gouia H, Masclaux C, and Ghorbel MH** (2003) Réversibilité des effets du cadmium sur la croissance et l'assimilation de l'azote chez la tomate (*Lycopersicon esculentum*) *Comptes Rendus Biologies* **326** (4) : 401-412
- Chang A, Fink GR** (1995) Targeting of the yeast plasma membrane [H<sup>+</sup>] ATPase: a novel gene AST1 prevents mislocalization of mutant ATPase to the vacuole. *J Cell Biol* **128** : 39-49

- Chen F, Hasegawa H, Schmitt-Ulms G, Kawarai T, Bohm C, Katayama T, Gu Y et al.** (2006) TMP21 is a presenilin complex component that modulates gamma-secretase but not epsilon-secretase activity. *Nature* **440** (7088):1208-1212
- Chiang CS, Stacey, Gary, & Tsay YF** (2004). Mechanisms and functional properties of two peptide transporters, AtPTR2 and fPTR2. *The Journal of biological chemistry* **279** (29) : 30150-30157.
- Choi YE, Emiko H, Gwang-Hoon K, Eui-Soo Y, and Hiroshi S** (2004) Distribution of elements on tobacco trichomes and leaves under cadmium and sodium stresses. *Journal of Plant Biology* **47** (2) : 75-82.
- Choi YE, Harada E, Wada M, Tsuboi H, Morita Y, Kusano T, Sano H** (2001) Detoxification of cadmium in tobacco plants: formation and active excretion of crystals containing cadmium and calcium through trichomes. *Planta* **213** : 45-50
- Christensen A, Svensson K, Persson S, Jung J, Michalak M, Widell S, Sommarin M** (2008) Functional characterization of Arabidopsis calreticulin1a: a key alleviator of endoplasmic reticulum stress. *Plant Cell Physiol* **49** : 912-924
- Chrispeels MJ and Raikhel NV** (1992) Short peptide domains target proteins to plant vacuoles. *Cell* **68** : 613-616
- Clemens S** (2006) Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. *Biochimie* **88** : 1707-1719
- Clemens S, Antosiewicz DM, Ward JM, Schachtman DP, Schroeder JI** (1998) The plant cDNA LCT1 mediates the uptake of calcium and cadmium in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95** : 12043-12048
- Clemens S, Kim EJ, Neumann D, Schroeder JI** (1999) Tolerance to toxic metals by a gene family of phytochelatin synthases from plants and yeast. *Embo J* **18** : 3325-3333
- Clough T, Key M, Ott I, Ragg S, Schadow G, Vitek O** (2009) Protein quantification in label-free LC-MS experiments. *Journal of Proteome Research* **8** (11): 5275–5284
- Cobbett CS** (2000) Phytochelatins and their roles in heavy metal detoxification. *Plant Physiol* **123** : 825-832
- Cobbett CS, May MJ, Howden R, Rolls B** (1998) The glutathione-deficient, cadmium-sensitive mutant, cad2-1, of *Arabidopsis thaliana* is deficient in gamma-glutamylcysteine synthetase. *Plant J* **16** : 73-78
- Collinge DB, Kragh KM, Mikkelsen JD, Nielsen KK, Rasmussen U, Vad K** (1993) Plant chitinases. *Plant J* **3** : 31-40
- Comisarow MB and Marshall AG** (1976) Theory of Fourier-Transform Ion-Cyclotron Resonance Mass-Spectroscopy Fundamental Equations and Low-Pressure Line-Shape. *Journal of Chemical Physics* **64** (1): 110-119
- Connolly EL, Fett JP, Guerinot ML** (2002) Expression of the IRT1 metal transporter is controlled by metals at the levels of transcript and protein accumulation. *Plant Cell* **14** : 1347-1357
- Conradt B, Shaw J, Vida T, Emr S, Wickner W** (1992) In vitro reactions of vacuole inheritance in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* **119** : 1469-1479
- Cotton RD** (1972) Environmental quality. *Arch Environ Health* **24**(4) : 288-299
- Coux O, Tanaka K, Goldberg AL** (1996) Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Annu. Rev. Biochem.* **65**, 801-847
- Cox J, Matic M, Hilger M, Nagaraj N, Selbach M, Olsen JV, Mann M** (2009) A practical guide to the MaxQuant computational platform for SILAC-based quantitative proteomics. *Nature protocols* **4** (5) : 698-705
- Cox J and Mann M** (2008) MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nature biotechnology* **26** (12)
- Cram J** (1983) Characteristics of Sulfate Transport Across Plasmalemma and Tonoplast of Carrot Root Cells. *Plant Physiol* **72** : 204-211
- Crowell DN, Huizinga DH, Deem AK, Trobaugh C, Denton R, Sen SE** (2007) *Arabidopsis thaliana* plants possess a specific farnesylcysteine lyase that is involved in detoxification and recycling of farnesylcysteine. *Plant Journal* **50** : 839-847
- Crow J, William FD and Fink GR** (1998) Anecdotal , Historical and Critical Commentaries on Genetics Anatomy of a Revolution. *Security*
- Curie C, Briat JF** (2003) Iron transport and signaling in plants. *Annu Rev Plant Biol* **54** : 183-206



- Curie C, Panaviene Z, Loulergue C, Dellaporta SL, Briat JF, Walker EL** (2001) Maize yellow stripe1 encodes a membrane protein directly involved in Fe(III) uptake. *Nature* **409** : 346-349

## D

- Dahlqvist A, Stahl U, Lenman M, Banas A, Lee M, Sandager L, Ronne H, Stymne S** (2000) Phospholipid:diacylglycerol acyltransferase: an enzyme that catalyzes the acyl-CoA-independent formation of triacylglycerol in yeast and plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97** : 6487-6492
- Dalton TP, He L, Wang B, Miller ML, Jin L, Stringer KF, Chang X, Baxter CS, Nebert DW** (2005) Identification of mouse SLC39A8 as the transporter responsible for cadmium-induced toxicity in the testis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102** : 3401-3406
- Dameron CT, Smith BR, Winge DR** (1989) Glutathione-coated cadmium-sulfide crystallites in *Candida glabrata*. *J Biol Chem* **264** : 17355-17360
- Darie CC, Biniossek ML, Winter V, Mutschler B and Haehnel W** (2005) Isolation and structural characterization of the Ndh complex from mesophyll and bundle sheath chloroplasts of *Zea mays*. *The FEBS journal* **272** (11) : 2705-2716.
- Davies DR** (1990) The structure and function of the aspartic proteinases. *Annu Rev Biophys Biophys Chem* **19** : 189-215
- Davies JM, Poole RJ, Rea PA, Sanders D** (1992) Potassium transport into plant vacuoles energized directly by a proton-pumping inorganic pyrophosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89** : 11701-11705
- Davies JM, Rea PA, Sanders D** (1991) Vacuolar proton-pumping pyrophosphatase in *Beta vulgaris* shows vectorial activation by potassium. *FEBS Lett* **278** : 66-68
- De Angeli A, Monachello D, Ephritikhine G, Frachisse JM, Thomine S, Gambale F, Barbier-Brygoo H** (2006) The nitrate/proton antiporter AtCLCa mediates nitrate accumulation in plant vacuoles. *Nature* **442** : 939-942
- De Leon JLD, Daie J, Wyse R** (1988) Tonoplast Stability and Survival of Isolated Vacuoles in Different Buffers. *Plant Physiol* **88**
- De DN** (2000) Plant cell vacuoles, an introduction. CSIRO publishing, Collingwood pp288 ISBN 0643 062548
- De Vries SC** (2007) 14-3-3 proteins in plant brassinosteroid signaling. *Dev Cell* **13** : 162-164
- Deckert J** (2005) Cadmium toxicity in plants: is there any analogy to its carcinogenic effect in mammalian cells? *Biometals* **18** : 475-481
- DeWald DB, Torabinejad J, Jones CA, Shope JC, Cangelosi AR, Thompson JE, Prestwich GD, Hama H** (2001) Rapid accumulation of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and inositol 1,4,5-trisphosphate correlates with calcium mobilization in salt-stressed arabidopsis. *Plant Physiol* **126** : 759-769
- Dietz KJ, Jager R, Kaiser G, Martinoia E** (1990) Amino Acid Transport across the Tonoplast of Vacuoles Isolated from Barley Mesophyll Protoplasts : Uptake of Alanine, Leucine, and Glutamine. *Plant Physiol* **92** : 123-129
- Dijkstra M, Havinga R, Vonk RJ, Kuipers F** (1996) Bile secretion of cadmium, silver, zinc and copper in the rat. Involvement of various transport systems. *Life Sci*. **59**(15): 1237-1246
- Dolan JW et al.**, (1999) Reversed-phase liquid chromatographic separation of complex samples by optimizing temperature and gradient time I. Peak capacity limitations. *J Chromatogr A* **857**(1-2) : 1-20
- Domon B and Aebersold R** (2006) Mass spectrometry and protein analysis. *Science* **312** (5771) : 212-217
- Dougherty MK, Morrison DK** (2004) Unlocking the code of 14-3-3. *J Cell Sci* **117** : 1875-1884
- Du L, Poovaiah BW** (2005) Ca<sup>2+</sup>/calmodulin is critical for brassinosteroid biosynthesis and plant growth. *Nature* **437** : 741-745
- Duncan MW, Yergey AL and Patterson SD** (2009) Quantifying proteins by mass spectrometry: the selectivity of SRM is only part of the problem. *Proteomics* **9**(5) : 1124-1127
- Ducruix C, Junot C, Fievet JB, Villiers F, Ezan E, Bourguignon J** (2006) New insights into the regulation of phytochelatin biosynthesis in *A. thaliana* cells from metabolite profiling analyses. *Biochimie* **88** : 1733-1742



- Dunkley TP, Hester S, Shadforth IP, Runions J, Weimar T, Hanton SL, Griffin JL, Bessant C, Brandizzi F, Hawes C, Watson RB, Dupree P, Lilley KS** (2006) Mapping the Arabidopsis organelle proteome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103** : 6518-6523
- Dunn BM** (2002) Structure and mechanism of the pepsin-like family of aspartic peptidases. *Chem Rev* **102** : 4431-4458
- Dutilleul C, Jourdain A, Bourguignon J, Hugouvieux V** (2008) The Arabidopsis putative selenium-binding protein family: expression study and characterization of SBP1 as a potential new player in cadmium detoxification processes. *Plant Physiol* **147**: 239-251

---

## E

- Elliott MH, Smith DS, Parker CE, Borchers C** (2009) Current trends in quantitative proteomics. *Journal of mass spectrometry* **44** (12) : 1637-1660
- Emmerlich V, Linka N, Reinhold T, Hurth MA, Traub M, Martinoia E, Neuhaus HE** (2003) The plant homolog to the human sodium/dicarboxylic cotransporter is the vacuolar malate carrier. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100** : 11122-11126
- Endler A, Meyer S, Schelbert S, Schneider T, Weschke W, Peters SW, Keller F, Baginsky S, Martinoia E, Schmidt UG** (2006) Identification of a vacuolar sucrose transporter in barley and Arabidopsis mesophyll cells by a tonoplast proteomic approach. *Plant Physiol* **141** : 196-207
- Epp N, Rethmeier R, Krämer L, Ungermann C** (2011) Membrane dynamics and fusion at late endosomes and vacuoles - Rab regulation, multisubunit tethering complexes and SNAREs. *Eur J Cell Biol* **90** (9) : 779-785
- Eubel H, Meyer EH, Taylor NL, Bussell JD, O'Toole N, Heazlewood JL, Castleden I, Small ID, Smith SM, Millar H** (2008) Novel proteins, putative membrane transporters, and an integrated metabolic network are revealed by quantitative proteomic analysis of Arabidopsis cell culture peroxisomes. *Plant physiology* **148** (4) : 1809-1829.
- Ezaki B, Sasaki K, Matsumoto H, Nakashima S** (2005) Functions of two genes in aluminium (Al) stress resistance: repression of oxidative damage by the AtBCB gene and promotion of efflux of Al ions by the NtGDI1 gene. *J Exp Bot* **56** : 2661-2671

---

## F

- Fassett DW** (1975) Cadmium: biological effects and occurrence in the environment. *Annu Rev Pharmacol* **15** : 425-435
- Felle H** (1988) Cytoplasmic free calcium in *Riccia fluitans* L. and *Zea mays* L.: Interaction of Ca<sup>2+</sup> and pH? *Planta* **176** : 248-255
- Felle H** (1989) Ca-Selective Microelectrodes and Their Application to Plant Cells and Tissues. *Plant Physiol* **91** : 1239-1242
- Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM** (1989) Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science*. 246 (4926): 64-71 Review
- Ferro M, Salvi D, Brugièrè S, Miras S, Kowalski S, Louwagie M, Garin J, Joyard J, Rolland N** (2003) Proteomics of the chloroplast envelope membranes from Arabidopsis thaliana. *Mol Cell Proteomics* **2** : 325-345
- Ferro M, Salvi D, Rivière-Rolland H, Vermaat T, Seigneurin-Berny D, Grunwald D, Garin J, Joyard J, Rolland N** (2002) Integral membrane proteins of the chloroplast envelope: identification and subcellular localization of new transporters. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99** : 11487-11492
- Ferro M, Brugièrè S, Salvi D, Seigneurin-Berny D, and others** (2010) AT\_CHLORO, a Comprehensive Chloroplast Proteome Database with Subplastidial Localization and Curated Information on Envelope Proteins. *Molecular & Cellular Proteomics* **9** (6) : 1063
- Forestier C, Bouteau F, Leonhardt N, and Vavasseur A** (1998) Pharmacological properties of slow anion currents in intact guard cells of Arabidopsis. Application of the discontinuous single-electrode voltage-clamp to different species. *European journal of physiology* **436** (6) : 920-927

- Frangne N, Eggmann T, Koblishke C, Weissenbock G, Martinoia E, Klein M** (2002) Flavone glucoside uptake into barley mesophyll and Arabidopsis cell culture vacuoles. Energization occurs by H(+)-antiport and ATP-binding cassette-type mechanisms. *Plant Physiol* **128** : 726-733
- Fraser CM, Rider LW, Chapple C** (2005) An expression and bioinformatics analysis of the Arabidopsis serine carboxypeptidase-like gene family. *Plant Physiol* **138** : 1136-1148
- Frigerio L, Hinz G, and Robinson DG** (2008) Multiple vacuoles in plant cells: rule or exception? *Traffic* **9** (10) : 1564-1570.
- Fukao Y, Makoto H and Nishimura M** (2002) Proteomic analysis of leaf peroxisomal proteins in greening cotyledons of Arabidopsis thaliana. *Plant & cell physiology* **43** (7) : 689-96.
- Fukuda A, Yazaki Y, Ishikawa T, Koike S, Tanaka Y** (1998) Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Antiporter in Tonoplast Vesicles from Rice Roots. *Plant Cell Physiol* **39** : 196-201
- Fukushima A, Kusano M, Redestig H, Arita M, Saito K** (2009) Integrated omics approaches in plant systems biology. *Current opinion in chemical biology* **13** (5-6) : 532-538
- Fülöp V, Böcskei Z and Polgár L** (1998) Prolyl oligopeptidase: an unusual b-propeller domain regulates proteolysis. *Cell* **94** : 161-170
- Furuichi T, Cunningham KW, Muto S** (2001) A putative two pore channel AtTPC1 mediates Ca(2+) flux in Arabidopsis leaf cells. *Plant Cell Physiol* **42** : 900-905
- Fusaro VA, MDR, MJ P and CSA** (2009). Prediction of high-responding peptides for targeted protein assays by mass spectrometry. *Nature biotechnology* **27**(2) : 190-198

## G

- Gallien S, Duriez E and Domon B** (2011) Selected reaction monitoring applied to proteomics. *Journal of mass spectrometry* **46** (3) : 298-312.
- Garbarino J, Dupont FM** (1989) Rapid Induction of Na/H Exchange Activity in Barley Root Tonoplast. *Plant Physiol* **89** : 1-4
- Garcia-Brugger A, Lamotte O, Vandelle E, Bourque S, Lecourieux D, Poinssot B, Wendehenne D, Pugin A** (2006) Early signaling events induced by elicitors of plant defenses. *Mol Plant Microbe Interact* **19** : 711-724
- Gerbeau P, Guclu J, Ripoche P, Maurel C** (1999) Aquaporin Nt-TIPa can account for the high permeability of tobacco cell vacuolar membrane to small neutral solutes. *Plant Journal* **18** : 577-587
- Gerber SA, Rush J, Stemman O, Kirschner MK, Gygi SP** (2003) Absolute quantification of proteins and phosphoproteins from cell lysates by tandem MS. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **100** (12) : 6940-6945
- Gevaert K, Impens F, Ghesquière B, Van Damme P, Lambrechts A, Vandekerckhove J** (2008) Stable isotopic labeling in proteomics. *Proteomics* **8** (23-24) : 4873-85
- Giaginis C, Gatzidou E, Theocharis S** (2006) DNA repair systems as targets of cadmium toxicity *Toxicol Appl Pharmacol* **213** (3) :282-290
- Goerlach J, Willms-Hoff I** (1992) Glycine Uptake into Barley Mesophyll Vacuoles Is Regulated but Not Energized by ATP. *Plant Physiol* **99** : 134-139
- Golldack D, Vera P, Dietz KJ** (2003) Expression of subtilisin-like serine proteases in *Arabidopsis thaliana* is cell-specific and responds to jasmonic acid and heavy metals with developmental differences. *Physiol Plant* **118** : 64-73
- Gomes E, Jakobsen MK, Axelsen KB, Geisler M, Palmgren MG** (2000) Chilling tolerance in Arabidopsis involves ALA1, a member of a new family of putative aminophospholipid translocases. *Plant Cell* **12**(12) : 2441-2454
- Gong JM, Lee DA, Schroeder JI** (2003) Long-distance root-to-shoot transport of phytochelatin and cadmium in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100** : 10118-10123
- Goossens F, De Meester I, Vanhoof G., Hendricks D, Vriend G. and Scharpé S** (1995) The purification, characterization and analysis of primary and secondary-structure of prolyl oligopeptidase from human

- lymphocytes. Evidence that the enzyme belongs to the a/b hydrolase fold family. *Eur. J. Biochem* **233** : 432–441
- Gouw JW, Krijgsveld J, and Heck AJR** (2010) Quantitative proteomics by metabolic labeling of model organisms. *Molecular & cellular proteomics* **9** (1): 11-24.
- Grabov A, Blatt MR** (1999) A steep dependence of inward-rectifying potassium channels on cytosolic free calcium concentration increase evoked by hyperpolarization in guard cells. *Plant Physiol* **119** : 277-288
- Granstedt RC, Huffaker RC** (1982) Identification of the Leaf Vacuole as a Major Nitrate Storage Pool. *Plant Physiol* **70** : 410-413
- Griffin NM, Yu J, Long F, Oh P, Shore S, Li Y, A Koziol H, Schnitzer JE** (2010) Label-free, normalized quantification of complex mass spectrometry data for proteomic analysis. *Nature biotechnology* **28** (1) : 83-9.
- Grill E, Löffler S, Winnacker EL, Zenk MH** (1989) Phytochelatins, the heavy-metal-binding peptides of plants, are synthesized from glutathione by a specific gamma-glutamylcysteine dipeptidyl transpeptidase (phytochelatin synthase). *Proc Natl Acad Sci U S A* **86** : 6838-6842
- Grotz N, Fox T, Connolly E, Park W, Guerinot ML, Eide D** (1998) Identification of a family of zinc transporter genes from Arabidopsis that respond to zinc deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95** : 7220-7224
- Gruhler A, Schulze WX, Matthiesen R, Mann M, Jensen OE** (2005) Stable isotope labeling of *Arabidopsis thaliana* cells and quantitative proteomics by mass spectrometry. *Molecular & cellular proteomics* **4** (11) : 1697-709.
- Grzam A, Martin MN, Hell R, Meyer AJ** (2007) gamma-Glutamyl transpeptidase GGT4 initiates vacuolar degradation of glutathione S-conjugates in Arabidopsis. *FEBS Lett* **581**: 3131-3138
- Gu YQ, Pautot V, Holzer FM, Walling LL** (1996) A Complex Array of Proteins Related to the Multimeric Leucine Aminopeptidase of Tomato. *Plant Physiol* **110** : 1257-1266

## H

- Ha SB, Smith AP, Howden R, Dietrich WM, Bugg S, O'Connell MJ, Goldsbrough PB, Cobbett CS** (1999) Phytochelatin synthase genes from Arabidopsis and the yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Plant Cell* **11**: 1153-1164
- Hajibagheri MA, Flowers TJ** (1989) X-ray microanalysis of ion distribution within root cortical cells of the halophyte *Suaeda maritima* (L.) Dum. *Planta* **177** : 131-134
- Hall, JL** (2002) Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of experimental botany* **53** (366) : 1-11
- Harris NS, Taylor GJ** (2004) Cadmium uptake and translocation in seedlings of near isogenic lines of durum wheat that differ in grain cadmium accumulation. *BMC Plant Biol* **4** : 4
- Hart BA** (1986) Cellular and biochemical response of the rat lung to repeated inhalation of cadmium. *Toxicol Appl Pharmacol* **82** (2) : 281-291
- Hart BA, Potts RJ, Watkin RD** (2001) Cadmium adaptation in the lung - a double-edged sword? *Toxicology* **160** (1-3) : 65-70
- Haswell ES, Peyronnet R, Barbier-Brygoo H, Meyerowitz EM, Frachisse JM** (2008) Two MscS homologs provide mechanosensitive channel activities in the Arabidopsis root. *Curr Biol.* **18**(10) : 730-734
- Hatem R, Stefanovic A, Secco D, Bulak Arpat A, Gout E, Bligny R, and Poirier Y** (2011) Uncoupling phosphate deficiency from its major effects on growth and transcriptome via PHO1 expression in Arabidopsis. *The Plant journal* **65** (4) : 557-70
- Hatsugai N, Kuroyanagi M, Yamada K, Meshi T, Tsuda S, Kondo M, Nishimura M, Hara-Nishimura I** (2004) A plant vacuolar protease, VPE, mediates virus-induced hypersensitive cell death. *Science* **305**: 855-858
- Hawker JS, Smith GM, Phillips H, Wiskich JT** (1987) Sucrose Phosphatase Associated with Vacuole Preparations from Red Beet, Sugar Beet, and Immature Sugarcane Stem. *Plant Physiol* **84** : 1281-1285

- Hayashi Y, Yamada K, Shimada T, Matsushima R, Nishizawa NK, Nishimura M, Hara-Nishimura I (2001) A proteinase-storing body that prepares for cell death or stresses in the epidermal cells of Arabidopsis. *Plant Cell Physiol* **42** : 894-899
- He G, Luo W, Li P, Remmers C, Netzer W, Hendrick J, Bettayeb K, Flajolet M, Gorelick F, Wennogle FP, Greengard P (2010) Gamma-secretase activating protein, a therapeutic target for Alzheimer's disease. *Nature* **2** 467(7311): 95-98
- He L, Girijashanker K, Dalton TP, Reed J, Li H, Soleimani M, Nebert DW (2006) ZIP8, member of the solute-carrier-39 (SLC39) metal-transporter family: characterization of transporter properties. *Mol Pharmacol* **70** (1) : 171-180
- He ZL, Yang XE, Stoffella PJ (2005) Trace elements in agroecosystems and impacts on the environment. *J Trace Elem Med Biol* **19** (2-3) : 125-140
- Heazlewood JL, Howell KA, Whelan J, Millar AH (2003) Towards an analysis of the rice mitochondrial proteome. *Plant Physiol* **132** : 230-242
- Hebeler R, Oeljeklaus S, A Reidegeld K, Eisenacher M, Stephan C, Sitek B, Stühler K et al. (2008) Study of early leaf senescence in *Arabidopsis thaliana* by quantitative proteomics using reciprocal <sup>14</sup>N/<sup>15</sup>N labeling and difference gel electrophoresis. *Molecular & cellular proteomics* **7** (1) : 108-120
- Heineke D, Wildenberger K, Sonnewald U, Willmitzer L, Heldt HW (1994) Accumulation of hexoses in leaf vacuoles: Studies with transgenic tobacco plants expressing yeast-derived invertase in the cytosol, vacuole or apoplast. *Planta* **194**
- Heinemeyer J, Eubel H, Wehmhoner D, Jansch L, Braun HP (2004) Proteomic approach to characterize the supramolecular organization of photosystems in higher plants. *Phytochemistry* **65** : 1683-1692
- Henrissat B (1991) A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem J* **280** : 309-316
- Herbette S, Taconnat L, Hugouvieux V, Piette L, Magniette ML, Cuine S, Auroy P, Richaud P, Forestier C, Bourguignon J, Renou JP, Vavasseur A, Leonhardt N (2006) Genome-wide transcriptome profiling of the early cadmium response of Arabidopsis roots and shoots. *Biochimie* **88** : 1751-1765
- Herman E, Schmidt M (2004) Endoplasmic reticulum to vacuole trafficking of endoplasmic reticulum bodies provides an alternate pathway for protein transfer to the vacuole. *Plant Physiol* **136** : 3440-3446
- Hiatt HH (1975) Protecting the medical commons: who is responsible? *N Engl J Med*. **293** (5) : 235-41.
- Hill J, Phylip LH (1997) Bacterial aspartic proteinases. *FEBS Lett* **409** : 357-360
- Hiller NL, Akompong T, Morrow JS, Holder AA, Haldar K (2003) Identification of a Stomatin Orthologue in Vacuoles Induced in Human Erythrocytes by Malaria Parasites. *The J. of Biological Chemistry* **48** : 48413-48421.
- Hirai MY, Yano M, Goodenowe DB, Kanaya S, Kimura T, Awazuhara M, Arita M, Fujiwara T, Saito K (2004) Integration of transcriptomics and metabolomics for understanding of global responses to nutritional stresses in Arabidopsis thaliana. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 10205-10210
- Hirschi KD, Zhen RG, Cunningham KW, Rea PA, Fink GR (1996) CAX1, an H<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> antiporter from Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93** : 8782-8786
- Hoke SH, Morand KL, Greis KD, Baker TR, Harbol KL, Dobson RLM (2001) Transformations in pharmaceutical research and development, driven by innovations in multidimensional mass spectrometry-based technologies. *Int. J. Mass Spectrometry* **212** : 135-140
- Homeyer U, Schultz G (1988) Transport of phenylalanine into vacuoles isolated from barley mesophyll protoplasts. *Planta* **176**
- Hommerson P, Khan AM, De Jong GJ, Somsen GW (2011) Ionization techniques in capillary electrophoresis-mass spectrometry : principles, design, and application. *Mass Spectrometry Reviews* **30** (6) : 1096-1120
- Hopp W, Seitz HU (1987) The uptake of acylated anthocyanin into isolated vacuoles from a cell suspension culture of *Daucus carota*. *Planta* **170** : 74-85
- Horiguchi H, Teranishi H, Niiya K, Aoshima K, Katoh T, Sakuragawa N, Kasuya M (1994) Hypoproduction of erythropoietin contributes to anemia in chronic cadmium intoxication: clinical study on Itai-itai disease in Japan. *Arch Toxicol* **68** (10): 632-636

- Houde M, Bertholet S, Gagnon E, Brunet S et al.** (2003) Phagosomes are competent organelles for antigen cross-presentation. *Nature* **425** : 402-406
- Howden R, Goldsbrough PB, Andersen CR, Cobbett CS** (1995) Cadmium-sensitive, *cad1* mutants of *Arabidopsis thaliana* are phytochelatin deficient. *Plant Physiol* **107**: 1059-1066
- Huang CF, Yamaji N, Ma JF** (2010) Knockout of a Bacterial-Type ABC Transporter Gene, *AtSTAR1*, Results in Increased Al Sensitivity in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **153**(4):1669-1677
- Hugouvieux V, Dutilleul C, Jourdain A, Reynaud F, Lopez V, & Bourguignon J** (2009). *Arabidopsis* putative selenium-binding protein1 expression is tightly linked to cellular sulfur demand and can reduce sensitivity to stresses requiring glutathione for tolerance. *Plant physiology* **151**(2) 768-781
- Hunt DF et al.**, (1981) Sequence analysis of polypeptides by collision activated dissociation on a triple quadrupole mass spectrometer. *Biomed Mass Spectrom* **8**(9): p397-408
- Hutchins MU, Klionsky DJ** (2001) Vacuolar localization of oligomeric alpha-mannosidase requires the cytoplasm to vacuole targeting and autophagy pathway components in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **276** : 20491-20498
- Huttlin EL, Hegeman AD, Harms AC, Sussman MR** (2007) Comparison of full versus partial metabolic labeling for quantitative proteomics analysis in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular & cellular proteomics* **6** (5) : 860-881
- Hüve K, Dittrich A, Kindermann G, Slovik S, Heber U** (1995) Detoxification of SO<sub>2</sub> in conifers differing in SO<sub>2</sub>-tolerance. *Planta* **195**
- Hvorup RN, Winnen B, Chang AB, Jiang Y, Zhou XF, & Saier MH** (2003). The multidrug/oligosaccharidyl-lipid/polysaccharide (MOP) exporter superfamily. *European Journal of Biochemistry*, **270** (5)

## I

- Igarashi D, Miwa T, Seki M, Kobayashi M, Kato T, Tabata S, Shinozaki K, Ohsumi C** (2003) Identification of photorespiratory glutamate:glyoxylate aminotransferase (GGAT) gene in *Arabidopsis*. *Plant J* **33**: 975-987
- Imamura H, Nakano M, Noji H, Muneyuki E, Ohkuma S, Yoshida M, Yokoyama K** (2003) Evidence for rotation of V1-ATPase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100** : 2312-2315
- Ishida H, Yoshimoto K, Izumi M, Reisen D et al.** (2008) Mobilization of rubisco and stroma-localized fluorescent proteins of chloroplasts to the vacuole by an ATG gene-dependent autophagic process. *Plant Physiol.* **148** : 142-155
- Ishikawa T** (1992) The ATP-dependent glutathione S-conjugate export pump. *Trends Biochem Sci* **17**: 463-468

## J

- Jack DL, Yang NM, & Saier MH** (2001). The drug/metabolite transporter superfamily. *European journal of biochemistry / FEBS* **268** (13) : 3620-3639
- Jaquinod M, Villiers F, Kieffer-Jaquinod S, Hugouvieux V, Bruley C, Garin J, Bourguignon J** (2007a) A proteomics dissection of *Arabidopsis thaliana* vacuoles isolated from cell culture. *Mol Cell Proteomics* **6** : 394-412
- Jaquinod M, Villiers F, Kieffer-Jaquinod S, Hugouvieux V, Bruley C, Garin J, Bourguignon J** (2007b) A proteomics approach highlights a myriad of transporters in the *Arabidopsis thaliana* vacuolar membrane. *Plant Signaling & Behavior* **2** : 296-298
- Järup L** (2002) Cadmium overload and toxicity. *Nephrol Dial Transplant* **17** (2) : 35-39
- Järup L** (2003) Hazards of heavy metal contamination. *Br Med Bull.* **68** : 167-82
- Jarup L, Briggs D, de Hoogh C, Morris S, Hurt C, Lewin A, Maitland I, Richardson S, Wakefield J, Elliott P** (2002) Cancer risks in populations living near landfill sites in Great Britain. *Br J Cancer* **86** (11) : 1732-1736



- Jauh GY, Phillips TE, Rogers JC** (1999) Tonoplast intrinsic protein isoforms as markers for vacuolar functions. *Plant Cell* **11**: 1867-1882
- Jensen AG, Chemali M, Chapel A, Kieffer-Jaquinod S, Jadot M, Garin J, Journet A** (2007) Biochemical characterization and lysosomal localization of the mannose-6-phosphate protein p76 (hypothetical protein LOC196463). *The Biochemical journal* **402** (3) : 449-58.
- Johannes E, Brosnan JM, Sanders D** (1992) Parallel pathways for intracellular Ca<sup>2+</sup> release from the vacuole of higher plants. *The Plant Journal* **2** : 97-102
- Johanson U, Karlsson M, Johansson I, Gustavsson S, Sjoval S, Frayse L, Weig AR, Kjellbom P** (2001) The complete set of genes encoding major intrinsic proteins in Arabidopsis provides a framework for a new nomenclature for major intrinsic proteins in plants. *Plant Physiol* **126** : 1358-1369
- Jones AM, MacLean D, Studholme DJ, Serna-Sanz A, Andreasson E, Rathjen JP, Peck SC.** (2009) Phosphoproteomic analysis of nuclei-enriched fractions from Arabidopsis thaliana. *J Proteomics* **72**(3) : 439-51
- Journet A, Chapel A, Kieffer-Jaquinod S, Roux F, Garin G** (2002) Proteomic analysis of human lysosomes: application to monocytic and breast cancer cells. *Proteomics* **2** (8) : 1026-40.
- Juge N** (2006) Plant protein inhibitors of cell wall degrading enzymes. *Trends Plant Sci* **11**: 359-367

---

## K

---

- Kaake RM, Wang X and Huang L** (2010) Profiling of protein interaction networks of protein complexes using affinity purification and quantitative mass spectrometry. *Molecular & cellular proteomics* **9** (8) : 1650-1665
- Kagale S, Divi UK, Krochko JE, Keller WA, Krishna P** (2007) Brassinosteroid confers tolerance in *Arabidopsis thaliana* and Brassica napus to a range of abiotic stresses. *Planta* **225** : 353-364
- Kaiser G, Martinoia E, Wiemken A** (1989) Active transport of sulfate into the vacuole of plant cells provide halotolerance and can detoxify SO<sub>2</sub>. *J Plant Physiol* **133**
- Kapp, E. and F. Schutz** (2007) Overview of tandem mass spectrometry (MS/MS) database search algorithms. Curr Protoc Protein Sci, Chapter 25 Unit 25.2
- Kasprzewska A** (2003) Plant chitinases--regulation and function. *Cell Mol Biol Lett* **8** : 809-824
- Kataoka T, Watanabe-Takahashi A, Hayashi N, Ohnishi M, Mimura T, Buchner P, Hawkesford MJ, Yamaya T, Takahashi H** (2004) Vacuolar sulfate transporters are essential determinants controlling internal distribution of sulfate in Arabidopsis. *Plant Cell* **16** : 2693-2704
- Kaur N, Reumann S, and Hu J** (2009) Peroxisome Biogenesis and Function. *Plant biology* **7** (1): 1-41
- Kawachi M, Kobae Y, Mimura T, Maeshima M** (2008) Deletion of a histidine-rich loop of AtMTP1, a vacuolar Zn(2+)/H(+) antiporter of Arabidopsis thaliana, stimulates the transport activity. *J Biol Chem* **283** : 8374-8383
- Kawasaki-Nishi S, Nishi T, Forgac M** (2003) Proton translocation driven by ATP hydrolysis in V-ATPases. *FEBS Lett* **545** : 76-85
- Kebarle P, and Verkerk UH** (2009) Electrospray from ions in solution to ions in the gas phase, what we know. *Mass Spectrometry Reviews* : 898- 917.
- Keller F, Frehner M, Wiemken A** (1988) Sucrose Synthase, a Cytosolic Enzyme in Protoplasts of Jerusalem Artichoke Tubers (*Helianthus tuberosus* L.). *Plant Physiol* **88** : 239-241
- Kim DY, Bovet L, Maeshima M, Martinoia E, Lee Y** (2007) The ABC transporter AtPDR8 is a cadmium extrusion pump conferring heavy metal resistance. *Plant J* **50** : 207-218
- Kimura Y and Ohno A** (1998) A New Peptide-N<sub>4</sub>-(acetyl-β-glucosaminyl) asparagine Amidase from Soybean (Glycine max) Seeds: Purification and Substrate Specificity. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **62** (2)412-418
- Khandelwal A, Chandu D, Roe CM, Kopan R, Quatrano RS** (2007) Moonlighting activity of presenilin in plants is independent of gamma-secretase and evolutionarily conserved. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **104**(33):13337-13342

- Kirst ME, Meyer DJ, Gibbon BC, Jung R et al.** (2005) Identification and characterization of endoplasmic reticulum-associated degradation proteins differentially affected by endoplasmic reticulum stress. *Plant Physiol.* **138** : 218-231
- Klahre U, Noguchi T, Fujioka S, Takatsuto S, Yokota T, Nomura T, Yoshida S, Chua NH** (1998) The Arabidopsis DIMINUTO/DWARF1 gene encodes a protein involved in steroid synthesis. *Plant Cell* **10** : 1677-1690
- Klapheck S, Fliegner W, Zimmer I** (1994) Hydroxymethyl-phytochelatin [(gamma-glutamylcysteine)<sub>n</sub>-serine] are metal-induced peptides of the Poaceae. *Plant Physiol* **104**: 1325-1332
- Kleijnen MF, Kirkpatrick DS, Gygi SP** (2007) The ubiquitin-proteasome system regulates membrane fusion of yeast vacuoles. *EMBO J.* **26** 275-287
- Klein M, Geisler M, Suh SJ, Kolukisaoglu HU, Azevedo L, Plaza S, Curtis MD, Richter A, Weder B, Schulz B, Martinoia E** (2004) Disruption of AtMRP4, a guard cell plasma membrane ABC-type ABC transporter, leads to deregulation of stomatal opening and increased drought susceptibility. *Plant J* **39** : 219-236
- Kloetzel PM** (2004) Generation of major histocompatibility complex class I antigens: functional interplay between proteasomes and TPPII. *Nat Immunol* **5** : 661-669
- Kobae Y, Sekino T, Yoshioka H, Nakagawa T, Martinoia E, Maeshima M** (2006) Loss of AtPDR8, a plasma membrane ABC transporter of Arabidopsis thaliana, causes hypersensitive cell death upon pathogen infection. *Plant Cell Physiol* **47** : 309-318
- Koizumi M, Yamaguchi-Shinozaki K, Tsuji H, Shinozaki K** (1993) Structure and expression of two genes that encode distinct drought-inducible cysteine proteinases in Arabidopsis thaliana. *Gene* **129** : 175-182
- Koren'kov V, Park S, Cheng NH, Sreevidya C, Lachmansingh J, Morris J, Hirschi K, Wagner GJ** (2007) Enhanced Cd<sup>2+</sup>-selective root-tonoplast-transport in tobaccos expressing Arabidopsis cation exchangers. *Planta* **225** : 403-411
- Korenkov V, Hirschi K, Crutchfield JD, Wagner GJ** (2007) Enhancing tonoplast Cd/H antiport activity increases Cd, Zn, and Mn tolerance, and impacts root/shoot Cd partitioning in Nicotiana tabacum L. *Planta* **226** : 1379-1387
- Korshunova YO, Eide D, Clark WG, Guerinot ML, Pakrasi HB** (1999) The IRT1 protein from Arabidopsis thaliana is a metal transporter with a broad substrate range. *Plant Mol Biol* **40** : 37-44
- Kostiainen R, Kotiaho T, Kuuranne T, Auriola S** (2003) Liquid chromatography/atmospheric pressure ionization-mass spectrometry in drug metabolism studies. *J.Mass Spectrometry* **38** : 357-364
- Kovermann P, Meyer S, Hortensteiner S, Picco C, Scholz-Starke J, Ravera S, Lee Y, Martinoia E** (2007) The Arabidopsis vacuolar malate channel is a member of the ALMT family. *Plant J* **52** : 1169-1180
- Krämer U, Cotter-Howells JD, Charnock JM, Baker AJM, Smith JAC** (1996) Free histidine as a metal chelator in plants that accumulate nickel. *Nature* **379** : 635-638
- Krämer L, Ungermann C** (2011) HOPS drives vacuole fusion by binding the vacuolar SNARE complex and the Vam7 PX domain via two distinct sites. *Mol Biol Cell.* **22**(14) : 2601-2011
- Krause F** (2006) Detection and analysis of protein-protein interactions in organellar and prokaryotic proteomes by native gel electrophoresis: (Membrane) protein complexes and supercomplexes. *Electrophoresis* **27** (13): 2759-2781
- Krotz RM, Evangelou BP, Wagner GJ** (1989) Relationships between Cadmium, Zinc, Cd-Peptide, and Organic Acid in Tobacco Suspension Cells. *Plant Physiol* **91**: 780-787
- Kulaev I, Vagabov V, Kulakovskaya T** (1999) New aspects of inorganic polyphosphate metabolism and function. *J Biosci Bioeng* **88**: 111-129
- Kupper H, Lombi E, Zhao FJ, McGrath SP** (2000) Cellular compartmentation of cadmium and zinc in relation to other elements in the hyperaccumulator Arabidopsis halleri. *Planta* **212** : 75-84
- Kuroyanagi M, Yamada K, Hatsugai N, Kondo M, Nishimura M, Hara-Nishimura I** (2005) Vacuolar processing enzyme is essential for mycotoxin-induced cell death in Arabidopsis thaliana. *J Biol Chem* **280** : 32914-32920
- Kvesitadze G, Khatishvili G, Sadunishvili T, Ramsden JJ** (2006) Biochemical Mechanisms of Detoxification in Higher Plants. *Basis of Phytoremediation*

## L

- Lane TW, Saito MA, George GN, Pickering IJ, Prince RC, Morel FM** (2005) Biochemistry: a cadmium enzyme from a marine diatom. *Nature* **435** : 42
- Lange V, Picotti P, Domon B, Aebersold R** (2008) Selected reaction monitoring for quantitative proteomics: a tutorial. *Molecular systems biology* **4** (222) : 222
- Lanquar V, Kuhn L, Lelièvre F, Khafif M, Espagne C, Bruley C, Barbier-Brygoo H, Garin J, Thomine S** (2007) <sup>15</sup>N-metabolic labeling for comparative plasma membrane proteomics in Arabidopsis cells. *Proteomics* **7** (5) : 750-4
- Lanquar V, Lelievre F, Bolte S, Hames C, Alcon C, Neumann D, Vansuyt G, Curie C, Schroder A, Kramer U, Barbier-Brygoo H, Thomine S** (2005) Mobilization of vacuolar iron by AtNRAMP3 and AtNRAMP4 is essential for seed germination on low iron. *Embo J* **24** : 4041-4051
- Larsen PB, Cancel J, Rounds M, Ochoa V** (2007) Arabidopsis ALS1 encodes a root tip and stele localized half type ABC transporter required for root growth in an aluminum toxic environment. *Planta* **225** : 1447-1458
- Latz A, Becker D, Hekman M, Muller T, Beyhl D, Marten I, Eing C, Fischer A, Dunkel M, Bertl A, Rapp UR, Hedrich R** (2007) TPK1, a Ca(2+)-regulated Arabidopsis vacuole two-pore K(+) channel is activated by 14-3-3 proteins. *Plant J* **52** : 449-459
- Lee EJ, Iai H, Sano H, Koizumi N** (2005) Sugar responsible and tissue specific expression of a gene encoding AtCIPK14, an Arabidopsis CBL-interacting protein kinase. *Biosci Biotechnol Biochem* **69**: 242-245
- Lee EK, Kwon M, Ko JH, Yi H, Hwang MG, Chang S, Cho MH** (2004) Binding of sulfonyleurea by AtMRP5, an Arabidopsis multidrug resistance-related protein that functions in salt tolerance. *Plant Physiol* **134** : 528-538
- Lee J, Feng J, Campbell KB, Scheffler BE, Garrett WM, Thibivilliers S, Stacey G, et al.** (2009) Quantitative proteomic analysis of bean plants infected by a virulent and avirulent obligate rust fungus. *Molecular & cellular proteomic* **8** (1) : 19-31.
- Lee S, Kang BS** (2005) Expression of Arabidopsis phytochelatin synthase 2 is too low to complement an AtPCS1-defective Cad1-3 mutant. *Mol Cells* **19** : 81-87
- Lee SM, Hoang MH, Han HJ, Kim HS, Lee K, Kim KE, Kim DH, Lee SY, Chung WS** (2009) Pathogen inducible voltage-dependent anion channel (AtVDAC) isoforms are localized to mitochondria membrane in Arabidopsis. *Mol Cells* **27**(3): 321-327
- Lehfeldt C, Shirley AM, Meyer K, Ruegger MO, Cusumano JC, Viitanen PV, Strack D, Chapple C** (2000) Cloning of the SNG1 gene of Arabidopsis reveals a role for a serine carboxypeptidase-like protein as an acyltransferase in secondary metabolism. *Plant Cell* **12** : 1295-1306
- Leslie EM, Liu J, Klaassen CD, Waalkes MP.** (2006) Acquired cadmium resistance in metallothionein-I/II(-/-) knockout cells: role of the T-type calcium channel Cacnalpha1G in cadmium uptake. *Mol Pharmacol.* **69**(2): 629-39
- Li ZS, Lu YP, Zhen RG, Szczypka M, Thiele DJ, Rea PA** (1997) A new pathway for vacuolar cadmium sequestration in *Saccharomyces cerevisiae*: YCF1-catalyzed transport of bis(glutathionato)cadmium. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 42-47
- Lilley KS and Dupree P** (2007) Plant organelle proteomics. *Current opinion in plant biology* **10** (6) : 594-9
- Lin YF, Liang HM, Yang SY, Boch A, Clemens S, Chen CC, Wu JF, Huang JL, Yeh KC** (2009) Arabidopsis IRT3 is a zinc-regulated and plasma membrane localized zinc/iron transporter. *New Phytol.* **182** (2) : 392-404
- Liu W, Li D, Wang J, Xie H, Zhu Y, He F** (2009) Proteome-wide prediction of signal flow direction in protein interaction networks based on interacting domains. *Molecular & cellular proteomics* **8** (9) : 2063-2070
- Lombi E, Zhao FJ, McGrath SP, Young SD, Sacchi GA** (2001) Physiological evidence for a high-affinity cadmium transporter highly expressed in a *Thlaspi caerulescens* ecotype. *New Phytol* **149** : 53-60
- Loo JA, Loo RR, Light KJ, Edmonds CG, Smith RD.** (1992) Multiply charged negative ions by electrospray ionization of polypeptides and proteins. *Anal Chem.* **64**(1) : 81-88



- Lopez-Otin C, Overall CM** (2002) Protease degradomics : A new challenge for proteomics. *Nature reviews* **3** : 509-519
- Lu YP, Li ZS, Drozdowicz YM, Hortensteiner S, Martinoia E, Rea PA** (1998) AtMRP2, an Arabidopsis ATP binding cassette transporter able to transport glutathione S-conjugates and chlorophyll catabolites: functional comparisons with Atmrp1. *Plant Cell* **10** : 267-282
- Lu YP, Li ZS, Rea PA** (1997) AtMRP1 gene of Arabidopsis encodes a glutathione S-conjugate pump: isolation and functional definition of a plant ATP-binding cassette transporter gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94** : 8243-8248

## M

- Macherel D, Bourguignon J, Forest E, Faure M, Cohen-Addad C, Douce R** (1996) Expression, lipoylation and structure determination of recombinant pea H-protein in Escherichia coli. *Eur J Biochem* **236** : 27-33
- Maeshima M** (2001) TONOPLAST TRANSPORTERS: Organization and Function. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **52** : 469-497
- Makarov A** (2000) Electrostatic axially harmonic orbital trapping: a high-performance technique of mass analysis. *Anal Chem* **72**(6): 1156-1162
- Malinovsky FG, Brodersen P, Fiil BK, McKinney LV, Thorgrimsen S, Beck M, Nielsen HB, Pietra S, Zipfel C, Robatzek S, Petersen M, Hofius D, Mundy J Lazarus** (2010) a DUF300 protein, contributes to programmed cell death associated with arabidopsis acd11 and the hypersensitive response. *PLoS One* **5**(9):e12586
- Malmström J, Beck M, Schmidt A, Lange V, Deutsch EW, Aebersold R** (2009) Proteome-wide cellular protein concentrations of the human pathogen *Leptospira interrogans*. *Nature* **460** (7256): 762-765
- Mann M** (2006) Functional and quantitative proteomics using SILAC. *Nature reviews. Molecular cell biology* **7** (12) : 952-8
- Mano J, Belles-Boix E, Babiychuk E, Inze D, Torii Y, Hiraoka E, Takimoto K, Slooten L, Asada K, Kushnir S** (2005) Protection against photooxidative injury of tobacco leaves by 2-alkenal reductase. Detoxication of lipid peroxide-derived reactive carbonyls. *Plant Physiol* **139** : 1773-1783
- Maretzki A, Thom M** (1986) A Group Translocator for Sucrose Assimilation in Tonoplast Vesicles of Sugarcane Cells. *Plant Physiol* **80** : 34-37
- Mari S, Gendre D, Pianelli K, Ouerdane L, Lobinski R, Briat JF, Lebrun M, Czernic P** (2006) Root-to-shoot long-distance circulation of nicotianamine and nicotianamine-nickel chelates in the metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *J Exp Bot* **57**: 4111-4122
- Marrs KA, Alfenito MR, Lloyd AM, Walbot V** (1995) A glutathione S-transferase involved in vacuolar transfer encoded by the maize gene Bronze-2. *Nature* **375** : 397-400
- Martin RE, & Kirk K** (2004). The malaria parasite's chloroquine resistance transporter is a member of the drug/metabolite transporter superfamily. *Molecular biology and evolution* **21** (10) : 1938-1949
- Martinez J, Feltl T, Scanlon CH, Lumsden PJ, Machackova I** (2000) Subcellular localization of a high affinity binding site for D-myo-inositol 1,4,5-trisphosphate from *Chenopodium rubrum*. *Plant Physiol* **124** : 475-483
- Martinez O, Schmidt A, Salamfro J, Hoflack B, Roa M and Goud B** (1994) The Small GTP-binding Protein rab6 Functions in intra-Golgi Transport. *The Journal of Cell Biology* **127** (6) : 1575-1588
- Martinoia E, Heck U, Wiemken A** (1981) Vacuoles as storage compartments for nitrate in barley leaves. *Nature* **272**
- Martinoia E, Klein M, Geisler M, Bovet L, Forestier C, Kolukisaoglu Ü, Müller-Röber B et al.** (2002) Multifunctionality of plant ABC transporters - more than just detoxifiers. *Planta* **214** (3) : 345-355
- Martinoia E, Maeshima M, and Neuhaus HE** (2007) Vacuolar transporters and their essential role in plant metabolism. *Journal of experimental botany* **58** (1) : 83-102
- Martinoia E, Thume M, Vogt E, Rentsch D, Dietz KJ** (1991) Transport of Arginine and Aspartic Acid into Isolated Barley Mesophyll Vacuoles. *Plant Physiol* **97**: 644-650

- Mathys W** (1977) The Role of Malate, Oxalate, and Mustard Oil Glucosides in the Evolution of Zinc-Resistance in Herbage Plants. *Physiol. plant.* **40** : 130-136
- Matsui M, Fowler JH, Walling LL** (2006) Leucine aminopeptidases: diversity in structure and function. *Biol Chem* **387** : 1535-1544
- Matsui M, Stoop CD, von Arnim AG, Wei N, Deng XW** (1995) Arabidopsis COP1 protein specifically interacts in vitro with a cytoskeleton-associated protein, CIP1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92** : 4239-4243
- Mattiacci L, Dicke M, Posthumus MA** (1995) 18-Glucosidase: An elicitor of herbivore-induced plant odor that attracts host-searching parasitic wasps. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*
- Maurel C, Verdoucq L, Luu DT, Santoni V** (2008) Plant aquaporins: membrane channels with multiple integrated functions. *Annu Rev Plant Biol* **59** : 595-624
- Mayne RG, Kende H** (1986) Ethylene biosynthesis in isolated vacuoles of *Vicia faba* L. - requirement for membrane integrity. *Planta* **167** : 159-165
- Meijer AH, Lopes Cardoso MI, Voskuilen JT, de Waal A, Verpoorte R, Hoge JH** (1993) Isolation and characterization of a cDNA clone from *Catharanthus roseus* encoding NADPH:cytochrome P-450 reductase, an enzyme essential for reactions catalysed by cytochrome P-450 mono-oxygenases in plants. *Plant J* **4** : 47-60
- Mehta RA, Warmbardt RD, Mattoo AK** (1996) Tomato Fruit Carboxypeptidase (Properties, Induction upon Wounding, and Immunocytochemical Localization). *Plant Physio.* **110** (3) : 883-892.
- Michelet X, Djeddi A and Legouis R** (2010) Developmental and cellular functions of the ESCRT machinery in pluricellular organisms. *Biol. Cell* **102** : 191-202
- Mikola J, and Suolinna EM** (1971) Purification and properties of an inhibitor of microbial alkaline proteinases from barley *Arch. Biochem. Biophys* **144**, 566-575.
- Millar AH, Heazlewood JL, Kristensen BK, Braun HP, Møller IM.** (2005) The plant mitochondrial proteome. *Trends Plant Sci.* **10**(1):36-43 Review
- Minic Z** (2008) Physiological roles of plant glycoside hydrolases. *Planta* **227**: 723-740
- Minic Z, Jouanin L** (2006) Plant glycoside hydrolases involved in cell wall polysaccharide degradation. *Plant Physiol Biochem* **44**: 435-449
- Moreau P, Bessoule JJ, Mongrand S, Testet E, Vincent P, Cassagne C** (1998) Lipid trafficking in plant cells. *Prog Lipid Res* **37**: 371-391
- Mori M, Yoshida K, Ishigaki Y, Matsunaga T, Nikaido O, Kameda K, Kondo T** (2005) UV-B protective effect of a polyacylated anthocyanin, HBA, in flower petals of the blue morning glory, *Ipomoea tricolor* cv. Heavenly Blue. *Bioorg Med Chem* **13**: 2015-2020
- Morishita R, Kawagoshi A, Sawasaki T, Madin K, Ogasawara T, Oka T, Endo Y** (1999) Ribonuclease activity of rat liver perchloric acid-soluble protein, a potent inhibitor of protein synthesis. *J Biol Chem* **274**: 20688-20692
- Moriyasu Y, Tazawa M** (1988) Degradation of Proteins Artificially Introduced into Vacuoles of *Chara australis*. *Plant Physiol* **88**: 1092-1096
- Morsomme P, Dambly S, Maudoux O, Boutry M** (1998) Single point mutations distributed in 10 soluble and membrane regions of the *Nicotiana plumbaginifolia* plasma membrane PMA2 H<sup>+</sup>-ATPase activate the enzyme and modify the structure of the C-terminal region. *J Biol Chem* **273**: 34837-34842
- Mosolov VV and Valueva TA** (2001) Role of inhibitors of proteolytic enzymes in plant defense against phytopathogenic microorganisms. *Biochemistry* **69** (11) 1305-1309
- Moulis JM and Thévenod F** (2010) New perspectives in cadmium toxicity: an introduction *Biometals* **23** (5)
- Muller M, Irkens-Kiesecker U, Rubinstein B, Taiz L** (1996) On the mechanism of hyperacidification in lemon. Comparison of the vacuolar H<sup>(+)</sup>-ATPase activities of fruits and epicotyls. *J Biol Chem* **271**: 1916-1924
- Munford RS, Sheppard PO, O'Hara PJ** (1995) Saposin-like proteins (SAPLIP) carry out diverse functions on a common backbone structure. *J Lipid Res* **36** : 1653-1663
-

**N**

- Napier RM, Fowke LC, Hawes C, Lewis M, Pelham HR** (1992) Immunological evidence that plants use both HDEL and KDEL for targeting proteins to the endoplasmic reticulum. *J Cell Sci* **102** : 261-271
- Navazio L, Mariani P, Sanders D** (2001) Mobilization of Ca<sup>2+</sup> by cyclic ADP-ribose from the endoplasmic reticulum of cauliflower florets. *Plant Physiol* **125** : 2129-2138
- Nawrot TS, Staessen JA, Roels HA et al** (2010) Cadmium exposure in the population: from health risks to strategies of prevention. *Biometals*.
- Nesvizhskii, A.I., O. Vitek, and R. Aebersold** (2007) Analysis and validation of proteomic data generated by tandem mass spectrometry. *Nat Methods* **4** (10): 787-797
- Neuhaus HE** (2007) Transport of primary metabolites across the plant vacuolar membrane. *FEBS Lett* **581**: 2223-2226
- Nickerson DP, Brett CL, Merz AJ.** (2009) Vps-C complexes: gatekeepers of endolysosomal traffic. *Curr Opin Cell Biol* **21**(4):543-51
- Noda T, Matsuura A, Wada Y, Ohsumi Y** (1995) Novel system for monitoring autophagy in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun* **210**: 126-132
- Nozue M, Yamada K, Nakamura T, Kubo H, Kondo M, Nishimura M** (1997) Expression of a vacuolar protein (VP24) in anthocyanin-producing cells of sweet potato in suspension culture. *Plant Physiol* **115**: 1065-1072

**O**

- Olbrich A, Hillmer S, Hinz G, Olaviusson P, Robinson DG** (2007) Newly formed vacuoles in root meristems of barley and pea seedlings have characteristics of both protein storage and lytic vacuoles. *Plant Physiol* **145**: 1383-1394
- Orsomando G, de la Garza RD, Green BJ, Peng M, Rea PA, Ryan TJ, Gregory JF, 3rd, Hanson AD** (2005) Plant gamma-glutamyl hydrolases and folate polyglutamates: characterization, compartmentation, and co-occurrence in vacuoles. *J Biol Chem* **280** : 28877-28884
- Ortiz DF, Kreppel L, Speiser DM, Scheel G, McDonald G, Ow DW** (1992) Heavy metal tolerance in the fission yeast requires an ATP-binding cassette-type vacuolar membrane transporter. *Embo J* **11**: 3491-3499
- Ory S, Zhou M, Conrads TP, Veenstra TD, Morrison DK** (2003) Protein phosphatase 2A positively regulates Ras signaling by dephosphorylating KSR1 and Raf-1 on critical 14-3-3 binding sites. *Curr Biol* **13**: 1356-1364
- Oven M, Page JE, Zenk MH, Kutchan TM** (2002) Molecular characterization of the homo-phytochelatase synthase of soybean *Glycine max*: relation to phytochelatase synthase. *J Biol Chem* **277**: 4747-4754

**P**

- Pace HC, Brenner C** (2001) The nitrilase superfamily: classification, structure and function. *Genome Biol* **2**
- Palma JM, Corpas FJ and A del Río L** (2009) Proteome of plant peroxisomes: new perspectives on the role of these organelles in cell biology. *Proteomics* **9** (9) : 2301-2312
- Palma K, Thorgrimsen S, Malinovsky FG, Fiil BK, Nielsen HB, Brodersen P, Hofius D, Petersen M, Mundy J** (2010) Autoimmunity in *Arabidopsis* *acd11* Is Mediated by Epigenetic Regulation of an Immune Receptor. *PLoS Pathog* **20** (10)
- Pao SS, Paulsen IANT, & Saier MH** (1998). Major Facilitator Superfamily. *Microbiology*, **62** (1), 1-34.
- Papayannopoulos IA** (1995) The Interpretation of Collision-Induced Dissociation Tandem Mass-Spectra of Peptides. *Mass Spectrometry Reviews* **14**(1): 49-73
- Pappin, D.J., P. Hojrup, and A.J. Bleasby** (1993) Rapid identification of proteins by peptidemass fingerprinting. *Curr Biol* **3** (6): 327-332

- Partridge M, Murphy DJ** (2009) Roles of a membrane-bound caleosin and putative peroxxygenase in biotic and abiotic stress responses in Arabidopsis. *Plant Physiol. Biochem* **47** : 796-806.
- Passarinho PA, Van Hengel AJ, Fransz PF, de Vries SC** (2001) Expression pattern of the *Arabidopsis thaliana* AtEP3/AtchitIV endochitinase gene. *Planta* **212** : 556-567
- Paulusma CC, Oude Elferink RP.** (1997)The canalicular multispecific organic anion transporter and conjugated hyperbilirubinemia in rat and man. *J Mol Med* **75** (6) : 420-428 Review.
- Pei ZM, Ward JM, Schroeder JI** (1999) Magnesium Sensitizes Slow Vacuolar Channels to Physiological Cytosolic Calcium and Inhibits Fast Vacuolar Channels in Fava Bean Guard Cell Vacuoles. *Plant Physiol* **121** : 977-986
- Peiter E, Maathuis FJ, Mills LN, Knight H, Pelloux J, Hetherington AM, Sanders D** (2005) The vacuolar Ca<sup>2+</sup>-activated channel TPC1 regulates germination and stomatal movement. *Nature* **434** : 404-408
- Peltier JB, Emanuelsson O, Kalume DE, Ytterberg J, Friso G, Rudella A, Liberles DA, Soderberg L, Roepstorff P, von Heijne G, van Wijk KJ** (2002) Central functions of the luminal and peripheral thylakoid proteome of Arabidopsis determined by experimentation and genome-wide prediction. *Plant Cell* **14** : 211-236
- Peltier JB, Ytterberg AJ, Sun Q, van Wijk KJ.** (2004) New functions of the thylakoid membrane proteome of *Arabidopsis thaliana* revealed by a simple, fast, and versatile fractionation strategy. *J Biol Chem* **279** (47) : 49367-49383
- Pereira-Leal JB, Seabra MC** (2001) Evolution of the Rab family of small GTP-binding proteins. *J Mol Biol.* **313** (4) : 889-901
- Perfus-Barbeoch L, Leonhardt N, Vavasseur A, and Forestier C** (2002) Heavy metal toxicity: cadmium permeates through calcium channels and disturbs the plant water status. *The Plant journal* **32** (4) 539-48
- Perry RH, Graham Cooks R and Noll RJ** (2008) Orbitrap mass spectrometry: instrumentation, ion motion and applications. *Mass Spectrometry Reviews* : 661- 699
- Peterman TK, Sequeira AS, Samia JA, Lunde EE** (2006) Molecular cloning and characterization of patellin1, a novel sec14-related protein, from zucchini (*Cucurbita pepo*). *J Plant Physiol* **163** (11) : 1150-1158
- Petrak J, Ivanek R, Toman O, Cmejla R, Cmejlova J, Vyoral D, Zivny J, Vulpe CD** (2008) Déjà vu in proteomics. A hit parade of repeatedly identified differentially expressed proteins. *Proteomics* **8** (9) : 1744-9.
- Pflieger D, Bigeard J and Hirt H** (2011) Isolation and characterization of plant protein complexes by mass spectrometry. *Proteomics* **11** (9) : 1824-33.
- Pich A, Scholz G, Stephan UW** (1994) Iron-dependent changes of heavy metals, nicotianamine, and citrate in different plant organs and in the xylem exudate of two tomato genotypes. Nicotianamine as possible copper translocator. *Plant Soil* **165** : 189-196
- Picotti P, Bodenmiller B, Mueller LN, Domon B, and Aebersold R** (2009) Full dynamic range proteome analysis of *S. cerevisiae* by targeted proteomics. *Cell* **138** (4) : 795-806.
- Plant PJ, Gelli A, Blumwald E** (1994) Vacuolar chloride regulation of an anion-selective tonoplast channel. *J Membr Biol* **140** : 1-12
- Polce, M.J., D. Ren, and C. Wesdemiotis** (2000) Dissociation of the peptide bond in protonated peptides. *J Mass Spectrometry* **35**(12): 1391-1398
- Polge C, Jaquinod M, Holzer F, Bourguignon J, Walling L, & Brouquisse R** (2009). Evidence for the Existence in *Arabidopsis thaliana* of the Proteasome Proteolytic Pathway: ACTIVATION IN RESPONSE TO CADMIUM. *The Journal of biological chemistry* **284** (51) : 35412-35424
- Porter TN, Li Y and Raushel FM** (2004) Mechanism of the Dihydroorotase Reaction. *Biochemistry* **43** : 16285-16292
- Poschenrieder C, Gunse B, Barcelo J** (1989) Influence of Cadmium on Water Relations, Stomatal Resistance, and Abscissic Acid Content in Expanding Bean Leaves. *Plant Physiol* **90** : 1365-1371
- Potocka A, Zimowski J** (2008) Metabolism of conjugated sterols in eggplant. Part 2. Phospholipid : steryl glucoside acyltransferase. *Acta Biochim Pol* **55** : 135-140
- Pottosin, II, Schonknecht G** (2007) Vacuolar calcium channels. *J Exp Bot* **58** : 1559-1569

- Preisner J, Sprügel H, Komor E** (1992) Solute distribution between vacuole and cytosol of sugarcane suspension cells: Sucrose is not accumulated in the vacuole. *Planta* **186**
- Pueyo JJ, Chrispeels MJ, Herman EM** (1995) Degradation of transport-competent destabilized phaseolin with a signal for retention in the endoplasmic reticulum occurs in the vacuole. *Planta* **196** : 586-596

---

## Q

---

- Qi Y, Tsuda K, Nguyen LV, Wang X, Lin J, Murphy AS, Glazebrook J, Thordal-Christensen H, Katagiri F** (2011) Physical association of Arabidopsis hypersensitive induced reaction proteins (HIRs) with the immune receptor RPS2. *J Biol Chem*. Ahead of print

---

## R

---

- Rae TD, Schmidt PJ, Pufahl RA, Culotta VC, O'Halloran TV** (1999) Undetectable intracellular free copper: the requirement of a copper chaperone for superoxide dismutase. *Science* **284** : 805-808
- Ramvalho-Santos M, Pissarra J, Verissimo P, Pereira S, Salema R, Pires E, Faro CJ** (1997) Cardosin A, an abundant aspartic proteinase, accumulates in protein storage vacuoles in the stigmatic papillae of *Cynara cardunculus* L. *Planta* **203** : 204-212
- Rausser WE** (1995) Phytochelatins and related peptides. Structure, biosynthesis, and function. *Plant Physiol* **109** : 1141-1149
- Rautengarten C, Steinhauser D, Bussis D, Stintzi A, Schaller A, Kopka J, Altmann T** (2005) Inferring hypotheses on functional relationships of genes: Analysis of the *Arabidopsis thaliana* subtilase gene family. *PLoS Comput Biol* **1**: e40
- Ravanel S, Block MA, Rippert P, Jabrin S, Curien G, Rebeille F, Douce R** (2004) Methionine metabolism in plants: chloroplasts are autonomous for de novo methionine synthesis and can import S-adenosylmethionine from the cytosol. *J Biol Chem* **279** : 22548-22557
- Rawlings ND, Barrett AJ** (1995) Families of aspartic peptidases, and those of unknown catalytic mechanism. *Methods Enzymol* **248**: 105-120
- Rawlings ND, Morton FR, Kok CY, Kong J, Barrett AJ** (2008) MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res* **36**: D320-325
- Rawlings ND, Polgar L and Barrett AJ** (1991) A new family of serine-type peptidases related to prolyl oligopeptidase. *Biochem. J.* **279**, 907-91
- Rea PA, Kim Y, Sarafian V, Poole RJ, Davies JM, Sanders D** (1992) Vacuolar H(+)-translocating pyrophosphatases: a new category of ion translocase. *Trends Biochem Sci* **17**: 348-353
- Reese RN, White CA, Winge DR** (1992) Cadmium-Sulfide Crystallites in Cd-(gammaEC)(n)G Peptide Complexes from Tomato. *Plant Physiol* **98**: 225-229
- Reisen D, Marty F, Leborgne-Castel N** (2005) New insights into the tonoplast architecture of plant vacuoles and vacuolar dynamics during osmotic stress. *BMC Plant Biol* **5**: 13
- Reisinger V, and Eichacker LA** (2008) Solubilization of membrane protein complexes for blue native PAGE. *Journal of proteomics* **71** (3) (August): 277-83.
- Rennenberg H** (1984) The Fate of Excess Sulfur in Higher Plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **35**
- Rentsch D, Hirner B, Schmelzer E, Frommer WB** (1996) Salt stress-induced proline transporters and salt stress-repressed broad specificity amino acid permeases identified by suppression of a yeast amino acid permease-targeting mutant. *Plant Cell*. **8**(8): 1437-46.
- Reumann S** (2011) Toward a definition of the complete proteome of plant peroxisomes: Where experimental proteomics must be complemented by bioinformatics. *Proteomics* **11** (9) : 1764-1779
- Reumann S, Voitsekhovskaja O and Lillo C** (2010) From signal transduction to autophagy of plant cell organelles: lessons from yeast and mammals and plant-specific features. *Protoplasma*



- Rexroth S, Meyer zu Tittingdorf JMW, Krause F, A Dencher N, Seelert H** (2003) Thylakoid membrane at altered metabolic state: challenging the forgotten realms of the proteome. *Electrophoresis* **24** (16) : 2814-23
- Riens B, Lohaus G, Heineke D and Heldt HW** (1991) Amino Acid and Sucrose Content Determined in the Cytosolic, Chloroplastic, and Vacuolar Compartments and in the Phloem Sap of Spinach Leaves. *Plant Physiology* **97** (1) : 227-233.
- Roberts MR** (2003) 14-3-3 proteins find new partners in plant cell signalling. *Trends Plant Sci* **8** : 218-223
- Rockel B, Peters J, Muller SA, Seyit G, Ringler P, Hegerl R, Glaeser RM, Baumeister W** (2005) Molecular architecture and assembly mechanism of Drosophila tripeptidyl peptidase II. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102** : 10135-10140
- Roepstorff, P. and J. Fohlman** (1984) Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. *Biomed Mass Spectrometry* **11**(11): 601
- Rogers JC** (2008) Multiple vacuoles in plant cells. *Plant Physiol* **146** : 1024-1025; author reply 1026-1027
- Rojo E, Zouhar J, Kovaleva V, Hong S et al.** (2003) The AtC-VPS protein complex is localized to the tonoplast and the prevacuolar compartment in arabidopsis. *Mol. Biol. Cell* **14** : 361-369
- Rolland N, Ferro M, Seigneurin-Berny D, Garin J, Douce R, Joyard J** (2003) Proteomics of chloroplast envelope membranes. *Photosynth Res.* **78** (3) : 205-230
- Ronceret A, Gadea-Vacas J, Guilleminot J, Devic M** (2008) The alpha-N-acetyl-glucosaminidase gene is transcriptionally activated in male and female gametes prior to fertilization and is essential for seed development in Arabidopsis. *J Exp Bot.* **59** (13) : 3649-3659
- Roschinger W, Olgemoller B, Fingerhut R, Liebl B, Roscher AA** (2003) Advances in analytical mass spectrometry to improve screening for inherited metabolic diseases. *Eur. J. Pediatr.* **162** S67
- Ross PL, Huang YN, Marchese JN, Williamson B, Parker K, Hattan S, Khainovski N, et al.** (2004) Multiplexed protein quantitation in Saccharomyces cerevisiae using amine-reactive isobaric tagging reagents. *Molecular & cellular proteomics* **3** (12) : 1154-69
- Ryan CA** (1980) Wound-regulated synthesis and vacuolar compartmentation of proteinase inhibitors in plant leaves. *Curr Top Cell Regul* **17** : 1-23
- Ryan CA** (1989) Proteinase inhibitor gene families: strategies for transformation to improve plant defenses against herbivores. *Bioessays* **10** (1): 20-4

## S

---

- Saddler HD** (1970) The membrane potential of Acetabularia mediterranea. *J Gen Physiol* **55**(6) : 802-21
- Sadowski PG, Dunkley TP, Shadforth IP, Dupree P, Bessant C, Griffin JL, Lilley KS** (2006) Quantitative proteomic approach to study subcellular localization of membrane proteins. *Nat Protoc* **1** : 1778-1789
- Saftner RA, Daie J, Wyse RE** (1983) Sucrose Uptake and Compartmentation in Sugar Beet Taproot Tissue. *Plant Physiol* **72** : 1-6
- Salt DE, Wagner GJ** (1993) Cadmium transport across tonoplast of vesicles from oat roots. Evidence for a Cd<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup> antiport activity. *J Biol Chem* **268** : 12297-12302
- Salzer U and Prohaska R** (2001) Stomatin, flotillin-1, and flotillin-2 are major integral proteins of Erythrocyte lipid rafts. *Blood* **97**: 1141-1143
- Sánchez-Fernández R, Davies TG, Coleman JO, & Rea PA** (2001). The *Arabidopsis thaliana* ABC protein superfamily, a complete inventory. *The Journal of biological chemistry* **276** (32) : 30231-30244
- Sanderfoot A, and Raikhel NV** (1999) The specificity of vesicle trafficking: coat proteins and SNAREs. *The Plant cell* **11** (4) : 629-42
- Sanders D, Pelloux J, Brownlee C, Harper JF** (2002) Calcium at the crossroads of signaling. *Plant Cell* **14** : 401-417
- Sanita di Toppi L, Gabrielli R** (1999) Response to cadmium in higher plants. *Environmental and experimental botany* **41**: 105-130

- Sarafian V, Kim Y, Poole RJ, Rea PA** (1992) Molecular cloning and sequence of cDNA encoding the pyrophosphate-energized vacuolar membrane proton pump of *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89** : 1775-1779
- Saric T, Graef CI, Goldberg AL** (2004) Pathway for degradation of peptides generated by proteasomes: a key role for thimet oligopeptidase and other metallopeptidases. *J. Biol. Chem.* **279** : 46723-46732
- Sarkar S, Bhatnagar D, Yadav P** (1994) Cadmium-induced lipid peroxidation in rat liver slices: A possible involvement of hydroxyl radicals *Toxicol In Vitro* **8**(6) : 1239-42.
- Sarret G, Harada E, Choi YE, Isaure MP, Geoffroy N, Fakra S, Marcus MA, Birschwilks M, Clemens S, Manceau A** (2006) Trichomes of tobacco excrete zinc as zinc-substituted calcium carbonate and other zinc-containing compounds. *Plant Physiol* **141** : 1021-1034
- Sarry JE, Chen S, Collum RP, Liang S, Peng M, Lang A, Naumann B, Dzierszinski F, Yuan CX, Hippler M, Rea PA** (2007) Analysis of the vacuolar luminal proteome of *Saccharomyces cerevisiae*. *Febs J* **274** : 4287-4305
- Sarry JE, Kuhn L, Ducruix C, Lafaye A, Junot C, Hugouvieux V, Jourdain A, Bastien O, Fievet JB, Vaillhen D, Amekraz B, Moulin C, Ezan E, Garin J, Bourguignon J** (2006) The early responses of *Arabidopsis thaliana* cells to cadmium exposure explored by protein and metabolite profiling analyses. *Proteomics* **6** : 2180-2198
- Satarug S, Moore MR.** (2004) Adverse health effects of chronic exposure to low-level cadmium in foodstuffs and cigarette smoke. *Environ Health Perspect.* **112** (10) :1099-103 Review
- Sauer N, Stolz J** (1994) SUC1 and SUC2: two sucrose transporters from *Arabidopsis thaliana*; expression and characterization in baker yeast and identification of the histidine-tagged protein. *Plant J.* **6** (1): 67-77
- Sazuka T, Keta S, Shiratake K, Yamaki S, Shibata D** (2004) A proteomic approach to identification of transmembrane proteins and membrane-anchored proteins of *Arabidopsis thaliana* by peptide sequencing. *DNA Res* **11**: 101-113
- Schaaf G, Ludewig U, Erenoglu BE, Mori S, Kitahara T, von Wiren N** (2004) ZmYS1 functions as a proton-coupled symporter for phytosiderophore- and nicotianamine-chelated metals. *J Biol Chem* **279** : 9091-9096
- Schagger H, Pfeiffer K** (2000) Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *Embo J* **19** : 1777-1783
- Schagger H, von Jagow G** (1991) Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal Biochem* **199** : 223-231
- Schaller A, Ryan CA** (1994) Identification of a 50-kDa systemin-binding protein in tomato plasma membranes having Kex2p-like properties. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 11802-11806
- Schellmann S and Pimpl P** (2009) Coats of endosomal protein sorting: retromer and ESCRT. Current Opinion in Plant Biology **12** : 670–676
- Schmidt UG, Endler A, Schelbert S, Brunner A, Schnell M, Neuhaus HE, Marty-Mazars D, Marty F, Baginsky S, Martinoia E** (2007) Novel tonoplast transporters identified using a proteomic approach with vacuoles isolated from cauliflower buds. *Plant Physiol* **145** : 216-229
- Schneider S, Beyhl D, Hedrich R, Sauer N** (2008) Functional and Physiological Characterization of *Arabidopsis* INOSITOL TRANSPORTER1, a Novel Tonoplast-Localized Transporter for myo-Inositol. *Plant Cell*
- Schneider S, Hulpke S, Schulz A, Yaron I, Höll J, Imlau A, Schmitt B, Batz S, Wolf S, Hedrich R, Sauer N** (2011) Vacuoles release sucrose via tonoplast-localised SUC4-type transporters. *Plant Biol* **13**
- Schrader M and Dariush Fahimi H** (2008) The peroxisome: still a mysterious organelle. *Histochemistry and cell biology* **129** (4): 421-40
- Schroeder JL, Allen GJ, Hugouvieux V, Kwak JM, Waner D** (2001) Guard Cell Signal Transduction. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **52** : 627-658
- Seay MD, Dinesh-Kumar SP** (2005) Life after death: are autophagy genes involved in cell death and survival during plant innate immune responses? *Autophagy* **1**: 185-186
- Seifert GJ, Roberts K** (2007) The biology of arabinogalactan proteins. *Annu Rev Plant Biol* **58** : 137-161

- Seigneurin-Berny D, Rolland N, Garin J, Joyard J** (1999) Technical Advance: Differential extraction of hydrophobic proteins from chloroplast envelope membranes: a subcellular-specific proteomic approach to identify rare intrinsic membrane proteins. *Plant J.* **19** 217-228
- Senden MHMN, van der Meer AJGM, Verburg TG, Wolterbeek HT** (1995) Citric acid in tomato plant roots and its effect on cadmium uptake and distribution. *Plant Soil* **171**: 333-339
- Shah J** (2005) Lipids, lipases, and lipid-modifying enzymes in plant disease resistance. *Annu Rev Phytopathol* **43** : 229-260
- Shahriari M, Richter K, Keshavaiah C, Sabovljevic A, Huelskamp M, Schellmann S** (2011) The Arabidopsis ESCRT protein-protein interaction network. *Plant Mol Biol* **76** : 85-96
- Sherman J, McKay MJ, Ashman K, & Molloy MP** (2009). How specific is my SRM?: The issue of precursor and product ion redundancy. *Proteomics* **9** (5) : 1120-1123
- Shigaki T, Hirschi KD** (2006) Diverse functions and molecular properties emerging for CAX cation/H<sup>+</sup> exchangers in plants. *Plant Biol* **8** : 419-429
- Shimaoka T, Ohnishi M, Sazuka T, Mitsunashi N, Hara-Nishimura I, Shimazaki K, Maeshima M, Yokota A, Tomizawa K, Mimura T** (2004) Isolation of intact vacuoles and proteomic analysis of tonoplast from suspension-cultured cells of Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Physiol* **45** : 672-683
- Shinoda K, Tomita M, and Ishihama Y** (2010) emPAI Calc--for the estimation of protein abundance from large-scale identification data by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Bioinformatics* **26** (4) : 576-577
- Shockey MJ, Fulda MS and Browse JA** (2006) Arabidopsis Contains Nine Long-Chain Acyl-Coenzyme A Synthetase Genes That Participate in Fatty Acid and Glycerolipid Metabolism. *Plant Physiol.* **129**(4): 1710–1722.
- Simoes I, Faro C** (2004) Structure and function of plant aspartic proteinases. *Eur J Biochem* **271**: 2067-2075
- Skirycz A, Memmi S, De Bodt S, Maleux K, Obata T, Fernie AR, Devreese B, Inzé D** (2011) A reciprocal 15N-labeling proteomic analysis of expanding Arabidopsis leaves subjected to osmotic stress indicates importance of mitochondria in preserving plastid functions. *Journal of proteome research* **10** (3) : 1018-1029
- Snijders APL, De Vos MGJ, Wright PC** (2005) Novel Approach for Peptide Quantitation and Sequencing Based on N and 13 C Metabolic Labeling research articles. *Journal of Proteome Research.*
- Sohlenkamp C, Wood CC, Roeb GW, Udvardi MK** (2002) Characterization of Arabidopsis AtAMT2, a high-affinity ammonium transporter of the plasma membrane. *Plant Physiol.* **130**(4): 1788-96
- Song W, Steiner HY, Zhang L, Naider F, Stacey G, & Becker JM** (1996). Cloning of a second Arabidopsis peptide transport gene. *Plant physiology* **110** (1) : 171-178
- Staal M, Maathuis FJM, Elzenga JTM, Overbeek JHM, Prins HBA** (1991) Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiport activity in tonoplast vesicles from roots of the salt-tolerant *Plantago maritima* and the salt-sensitive *Plantago media*. *Physiol. plant.* **82** : 179–184
- Stacey G, Koh S, Granger C, Becker JM** (2002) Peptide transport in plants. *Trends Plant Sci* **7** : 257-263
- Stadler R, Truernit E, Gahrtz M, Sauer N** (1999) The AtSUC1 sucrose carrier may represent the osmotic driving force for anther dehiscence and pollen tube growth in Arabidopsis. *Plant J.* **19**(3): 269-78
- Stefanovic A, Bulak Arpat A, Bligny R, Gout E, Vidoudez C, Bensimon M and Poirier Y**, (2011) Over-expression of PHO1 in Arabidopsis leaves reveals its role in mediating phosphate efflux *The Plant journal* **66** (4) : 689-99
- Stohs SJ, Bagchi D, Hassoun E, Bagchi M.** (2000) Oxidative mechanisms in the toxicity of chromium and cadmium ions. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* **19**(3) : 201-13
- Strasser R, Bondili JS, Schoberer J, Svoboda B, Liebminger E, Glossl J, Altmann F, Steinkellner H, Mach L** (2007) Enzymatic properties and subcellular localization of Arabidopsis beta-N-acetylhexosaminidases. *Plant Physiol* **145** : 5-16
- Sung U, Jennings JL, Link AJ, Blakely RD** (2005) Proteomic analysis of human norepinephrine transporter complexes reveals associations with protein phosphatase 2A anchoring subunit and 14-3-3 proteins. *Biochem Biophys Res Commun* **333** : 671-678



- Szczypka MS, Wemmie JA, Moye-Rowley WS, Thiele DJ** (1994) A yeast metal resistance protein similar to human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) and multidrug resistance-associated protein. *J Biol Chem* **269** : 22853-22857
- Sze H** (1985) H<sup>+</sup>-translocating ATPases Advances using membrane vesicles. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **36** : 175-208
- Sze H, Liang F, Hwang I, Curran AC, Harper JF** (2000) Diversity and regulation of plant Ca<sup>2+</sup> pumps: insights from expression in yeast. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **51** : 433-462
- Sze H, Schumacher K, Muller ML, Padmanaban S, Taiz L** (2002) A simple nomenclature for a complex proton pump: VHA genes encode the vacuolar H<sup>(+)</sup>-ATPase. *Trends Plant Sci* **7**: 157-161
- Szponarski W, Sommerer N, Boyer JC, Rossignol M, Gibrat R** (2004) Large-scale characterization of integral proteins from Arabidopsis vacuolar membrane by two-dimensional liquid chromatography. *Proteomics* **4** : 397-406
- Szuster-Ciesielska A, Stachura A, Słotwińska M, Kamińska T, Sniezko R, Paduch R, Abramczyk D, Filar J, Kandefer-Szerszeń M.** (2000) The inhibitory effect of zinc on cadmium-induced cell apoptosis and reactive oxygen species (ROS) production in cell cultures. *Toxicology* **145** (2-3):159-71.

## T

- Tabet JC, Rebuffat S.** (2003) Nobel Prize 2002 for chemistry: mass spectrometry and nuclear magnetic resonance *Med Sci.* **19** (8-9):865-72
- Takahashi H, Watanabe-Takahashi A, Smith FW, Blake-Kalff M, Hawkesford MJ, Saito K** (2000) The roles of three functional sulphate transporters involved in uptake and translocation of sulphate in Arabidopsis thaliana. *Plant J* **23** : 171-182
- Talke IN, Hanikenne M, Kramer U** (2006) Zinc-dependent global transcriptional control, transcriptional deregulation, and higher gene copy number for genes in metal homeostasis of the hyperaccumulator Arabidopsis halleri. *Plant Physiol* **142** : 148-167
- Tambasco-Studart M, Titiz O, Raschle T, Forster G, Amrhein N, Fitzpatrick TB** (2005) Vitamin B6 biosynthesis in higher plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102** : 13687-13692
- Tateda C, Watanabe K, Kusano T, Takahashi Y** (2011) Molecular and genetic characterization of the gene family encoding the voltage-dependent anion channel in Arabidopsis. *J Exp Bot.*
- Taylor CB, Bariola PA, delCardayre SB, Raines RT, Green PJ** (1993) RNS2: a senescence-associated RNase of Arabidopsis that diverged from the S-RNases before speciation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90** : 5118-5122
- The Arabidopsis Genome Initiative (AGI)** (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant Arabidopsis thaliana. *Nature* **408** : 796-815
- Theodoulou FL** (2000) Plant ABC transporters. *Biochim Biophys Acta* **1465** : 79-103
- Thom M, Komor E** (1984) Role of the ATPase of sugar-cane vacuoles in energization of the tonoplast. *Eur J Biochem* **138** : 93-99
- Thomine S, Lelievre F, Debarbieux E, Schroeder JI, Barbier-Brygoo H** (2003) AtNRAMP3, a multispecific vacuolar metal transporter involved in plant responses to iron deficiency. *Plant J* **34**: 685-695
- Thomine S, Wang R, Ward JM, Crawford NM, Schroeder JI** (2000) Cadmium and iron transport by members of a plant metal transporter family in Arabidopsis with homology to Nramp genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97** : 4991-4996
- Timms JF, & Cramer R** (2008). Difference gel electrophoresis. *Proteomics*, **8** (23-24) : 4886-4897
- Torii KU** (2004) Leucine-rich repeat receptor kinases in plants: structure, function, and signal transduction pathways. *Int Rev Cytol* **234**: 1-46
- Tornero P, Mayda E, Gómez MD, Cañas L et al.** (1996) Characterization of LRP, a leucine-rich repeat (LRR) protein from tomato plants that is processed during pathogenesis. *Plant J.* **10** : 315-330
- Trinchella F, Riggio M, Filosa S, Volpe MG, Parisi E, Scudiero R.** (2006) Cadmium distribution and metallothionein expression in lizard tissues following acute and chronic cadmium intoxication. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* **144** (3) : 272-278

**Tyerman SD, Niemietz CM, Bramley H.** (2002) Plant aquaporins: multifunctional water and solute channels with expanding roles *Plant Cell Environ.* **25** (2) : 173-194

## U

**Uemura T, Yoshimura SH, Takeyasu K, Sato MH** (2002) Vacuolar membrane dynamics revealed by GFP-AtVam3 fusion protein. *Genes Cells* **7**: 743-753

**Unlu M, Morgan ME, Minden JS** (1997) Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts. *Electrophoresis* **18** : 2071-2077

**Urech K, Durr M, Boller T, Wiemken A, Schwencke J** (1978) Localization of polyphosphate in vacuoles of *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Microbiol* **116** : 275-278

## V

**Valko M, Morris H, Cronin MT** (2005) Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem* **12**(10) : 1161-1208

**Van Wijk KJ** (2004) Plastid proteomics. *Plant Physiol Biochem* **42** (12) : 963-977

**Van den Wijngaard PW, Bunney TD, Roobeek I, Schonknecht G, de Boer AH** (2001) Slow vacuolar channels from barley mesophyll cells are regulated by 14-3-3 proteins. *FEBS Lett* **488** : 100-104

**Van der Rest B, Boisson AM, Gout E, Bligny R, Douce R** (2002) Glycerophosphocholine metabolism in higher plant cells. Evidence of a new glyceryl-phosphodiester phosphodiesterase. *Plant Physiol* **130** : 244-255

**Vander Willigen C, Postaire O, Tournaire-Roux C, Boursiac Y, Maurel C** (2006) Expression and inhibition of aquaporins in germinating *Arabidopsis* seeds. *Plant Cell Physiol* **47** : 1241-1250

**Varshavsky AJ and Tobias JW** (1995) Ubiquitin-specific protease. *Biotechnology Advances* **13** (3) : 562-563

**Vatamaniuk OK, Bucher EA, Ward JT, Rea PA** (2001) A new pathway for heavy metal detoxification in animals. Phytochelatin synthase is required for cadmium tolerance in *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem* **276** : 20817-20820

**Vatamaniuk OK, Mari S, Lu YP, Rea PA** (1999) AtPCS1, a phytochelatin synthase from *Arabidopsis*: isolation and in vitro reconstitution. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96** : 7110-7115

**Vatamaniuk OK, Mari S, Lu YP, Rea PA** (2000) Mechanism of heavy metal ion activation of phytochelatin (PC) synthase: blocked thiols are sufficient for PC synthase-catalyzed transpeptidation of glutathione and related thiol peptides. *J Biol Chem* **275** : 31451-31459

**Vaudel M, Sickmann A, Martens L** (2010) Peptide and protein quantification: a map of the minefield. *Proteomics* **10** (4) : 650-670

**Vazquez-Flota F, Carrillo-Pech M, Minero-Garcia Y, De Lourdes Miranda-Ham M** (2004) Alkaloid metabolism in wounded *Catharanthus roseus* seedlings. *Plant Physiol Biochem* **42** : 623-628

**Veljanovski V, Vanderbeld B, Knowles VL, Snedden WA, Plaxton WC** (2006) Biochemical and molecular characterization of AtPAP26, avacuolar purple acid phosphatase up-regulate in phosphate-deprived *Arabidopsis* suspension cells and seedlings. *Plant Physiol* **142** (3) : 1282-1293

**Vercammen D, Belenghi B, van de Cotte B, Beunens T, Gavigan JA, De Rycke R, Brackenier A, Inze D, Harris JL, Van Breusegem F** (2006) Serpin1 of *Arabidopsis thaliana* is a suicide inhibitor for metacaspase 9. *J Mol Biol* **364** : 625-636

**Verbruggen, N., Hermans, C., Schat, H.** (2009) Molecular mechanisms of metal hyperaccumulation in plants. *New Phytol.* **181** : 759-776

**Verougstraete V, Lison D and Hotz P** (2003) Cadmium, lung and prostate cancer: a systematic review of recent epidemiological data. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* **6** (3) : 227-255

**Verret F, Gravot A, Auroy P, Leonhardt N, David P, Nussaume L, Vavasseur A, Richaud P** (2004) Overexpression of AtHMA4 enhances root-to-shoot translocation of zinc and cadmium and plant metal tolerance. *FEBS Lett* **576** : 306-312

- Verrier PJ, Bird D, Burla B, Dassa E, Forestier C, Geisler M, Klein M et al.** (2008). Plant ABC proteins-a unified nomenclature and updated inventory. *Trends in Plant Science* **13** (4) :151-159
- Vert G, Briat JF, Curie C** (2001) Arabidopsis IRT2 gene encodes a root-periphery iron transporter. *Plant J* **26** : 181-189
- Vert G, Grotz N, Dedaldechamp F, Gaymard F, Guerinot ML, Briat JF, Curie C** (2002) IRT1, an Arabidopsis transporter essential for iron uptake from the soil and for plant growth. *Plant Cell* **14** : 1223-1233
- Villiers F, Ducruix C, Hugouvieux V, Jarno N, Ezan E, Garin J, Junot C, Bourguignon J** (2011) Investigating the plant response to cadmium exposure by proteomic and metabolomic approaches. *Proteomics* **11** (9) : 1650-63.
- Villiers TA** (1967) Cytolysosomes in Long-dormant Plant Embryo Cells. *Nature* **214** : 1356-1357
- Vogeli-Lange R, Wagner GJ** (1990) Subcellular Localization of Cadmium and Cadmium-Binding Peptides in Tobacco Leaves : Implication of a Transport Function for Cadmium-Binding Peptides. *Plant Physiol* **92** : 1086-1093
- Voß M, Weidner M** (1988) Uridine 5'-diphospho-D-glucose-dependent vectorial sucrose synthesis in tonoplast vesicles of the storage hypocotyl of red beet (*Beta vulgaris* L. ssp. *conditiva*). *Planta* **173** : 96-103

---

## W

---

- Waalkes MP** (2003) Cadmium carcinogenesis. *Mutat Res.* **533** (1-2) :107-120
- Wagner GJ** (1981) Vacuolar Deposition of Ascorbate-derived Oxalic Acid in Barley. *Plant Physiol* **67**: 591-593
- Waisberg M, Joseph P, Hale B and Beyersmann D,** (2003) Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis. *Toxicology* **192** (2-3) : 95-117
- Walker RR, Leigh RA** (1981) Mg<sup>2+</sup>-Dependent, cation-stimulated inorganic pyrophosphatase associated with vacuoles isolated from storage roots of red beet (*Beta vulgaris* L.). *Planta* **153**
- Wang P, Bouwman FG and Mariman ECM** (2009) Generally detected proteins in comparative proteomics--a matter of cellular stress response? *Proteomics* **9** (11) : 2955-2966
- Wang J, Evangelou BP, Nielsen MT, Wagner GJ** (1991) Computer-Simulated Evaluation of Possible Mechanisms for Quenching Heavy Metal Ion Activity in Plant Vacuoles: I. Cadmium. *Plant Physiol* **97**: 1154-1160
- Wang P, Bouwman FG and Mariman ECM** (2009) Generally detected proteins in comparative proteomics--a matter of cellular stress response? *Proteomics* **9** (11) : 2955-66
- Ward JM, Pei ZM, Schroeder JI** (1995) Roles of Ion Channels in Initiation of Signal Transduction in Higher Plants. *Plant Cell* **7**: 833-844
- Washburn MP, Wolters D and Yates JR** (2001) Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. *Nat Biotechnol* **19**(3): 242-247
- Wätjen W, Beyersmann D** (2004) Cadmium-induced apoptosis in C6 glioma cells: influence of oxidative stress. *Biometals* **17**(1) : 65-78
- Weise A, Barker L, Kuhn C, Lalonde S, Buschmann H, Frommer WB, Ward JM** (2000) A new subfamily of sucrose transporters, SUT4, with low affinity/high capacity localized in enucleate sieve elements of plants. *Plant Cell* **12** : 1345-1355
- Weschke W, Panitz R, Sauer N, Wang Q, Neubohn B, Weber H, Wobus U** (2000) Sucrose transport into barley seeds: molecular characterization of two transporters and implications for seed development and starch accumulation. *Plant J* **21**: 455-467
- Westenberg B, Boller T, Wiemken A** (1989) Lack of arginine- and polyphosphate storage pools in a vacuole-deficient mutany (end 1) of *S. cerevisiae*. *FEBS letters* **254**: 133-136
- Whitehouse CM, Dreyer RN, Yamashita M, Fenn JB** (1985) Electrospray interface for liquid chromatographs and mass spectrometers. *Anal Chem.* **57**(3):675-9
- Whiteman SA, Nühse TS, Ashford DA, Sanders D, Maathuis FJM** (2008) A proteomic and phosphoproteomic analysis of *Oryza sativa* plasma membrane and vacuolar membrane. *The Plant journal: for cell and molecular biology* **56** (1) : 146-156

- Withers SG., Warren RAJ, Street IP, Rupitz K, Kempton JB & Aebersold R** (1990) *J. Am. Chem. Soc.* **112** : 5887-5889
- Wilson C, Lucas WJ** (1987) Influence of Internal Sugar Levels on Apoplasmic Retrieval of Exogenous Sucrose in Source Leaf Tissue. *Plant Physiol* **84**: 1088-1095
- Winter H, Robinson DG, Heldt HW** (1993) Subcellular volumes and metabolic concentrations in barley leaves. *Planta* **191**
- Winter H, Robinson DG, Heldt HW** (1994) Subcellular volumes and metabolic concentrations in spinach leaves. *Planta* **191**
- Wodzicki TJ, Humphreys WJ** (1973) Maturing pine tracheids. Organization of intravacuolar cytoplasm. *J Cell Biol* **56** : 263-265
- Wormit A, Trentmann O, Feifer I, Lohr C, Tjaden J, Meyer S, Schmidt U, Martinoia E, Neuhaus HE** (2006) Molecular identification and physiological characterization of a novel monosaccharide transporter from Arabidopsis involved in vacuolar sugar transport. *Plant Cell* **18**: 3476-3490
- Wu JS, Sung HY, Juang RH** (1995) Transformation of cadmium-binding complexes during cadmium sequestration in fission yeast. *Biochem Mol Biol Int* **36** : 1169-1175
- Wolf-Yadlin A, Hautaniemi S, A Lauffenburger D, White FM** (2007) Multiple reaction monitoring for robust quantitative proteomic analysis of cellular signaling networks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **104** (14) : 5860-5.
- Wolters, D.A., M.P. Washburn, and J.R. Yates** (2001) An automated multidimensional protein identification technology for shotgun proteomics. *Anal Chem* **73** (23): 5683-5690
- Wysocki VH et al.,** (2000) Mobile and localized protons: a framework for understanding peptide dissociation. *J Mass Spectrom* **35** (12): 1399-1406

## Y

---

- Yamasaki H, Sakihama Y, Ikehara N** (1997) Flavonoid-Peroxidase Reaction as a Detoxification Mechanism of Plant Cells against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Plant Physiol* **115** : 1405-1412
- Yokota T** (1997) The structure, biosynthesis and function of brassinosteroids. *trends in plant science* **2**: 137-143
- Yoshida S, Uemura M** (1986) Lipid Composition of Plasma Membranes and Tonoplasts Isolated from Etiolated Seedlings of Mung Bean (*Vigna radiata* L.). *Plant Physiol* **82** : 807-812
- Yost RA, Enke CG** (1979) Triplequadrupole mass spectrometry for direct mixture analysis and structure elucidation. *Anal. Chem.* **51** : 1251-1256
- Yu CT, Li JH, Lee TC, Lin LF** (2008) Characterization of cocaine-elicited cell vacuolation: the involvement of calcium/calmodulin in organelle deregulation. *J Biomed Sci* **15** : 215-226

## Z

---

- Zybailov B, Rutschow H, Friso G, Rudella A, Emanuelsson O, Sun Q, van Wijk KJ** (2008) Sorting signals, N-terminal modifications and abundance of the chloroplast proteome. *PLoS ONE* **3**: e1994



aire d’*Arabidopsis thaliana* a été réalisée. La connaissance de la localisation subcellulaire lantes du compartiment étudié. Une tâche si précise est complexe puisqu’elle nécessite la de plusieurs approches de protéomique a permis d’identifier les protéines présentes dans olaires. Cette protéothèque de référence constitue une base pour étudier la dynamique du

*thaliana* vacuolar proteome was performed. Protein subcellular localization knowledge is an ent. This task involves pitfalls and requires that either organelle preparations are free of e combination of several proteomic approaches attempt to present soluble and membrane nces to study the vacuolar proteome dynamics in response to different stresses including of vacuoles during cadmium stress.